

## TENT COOPERATION TRE /

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
 United States Patent and Trademark  
 Office  
 Box PCT  
 Washington, D.C.20231  
 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 24 February 2000 (24.02.00)	
<b>International application No.</b> PCT/NL99/00470	<b>Applicant's or agent's file reference</b> P10171PC00
<b>International filing date</b> (day/month/year) 21 July 1999 (21.07.99)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 21 July 1998 (21.07.98)
<b>Applicant</b> PUIJK, Wouter, Cornelis	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

13 January 2000 (13.01.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<b>The International Bureau of WIPO</b> 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	<b>Authorized officer</b>  Nestor Santesso Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	--

## TENT COOPERATION TRF Y

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

To:

OTTEVANGERS, S., U.  
Vereenigde  
Nieuwe Parklaan 97  
NL-2587 BN The Hague  
PAYS-BAS

Date of mailing (day/month/year) 19 April 2000 (19.04.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference P10171PC00	
International application No. PCT/NL99/00470	International filing date (day/month/year) 21 July 1999 (21.07.99)

1. The following indications appeared on record concerning:			
<input type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor	<input checked="" type="checkbox"/> the agent	<input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address OTTEVANGERS, S., U. Vereenigde Octrooibureaux Nieuwe Parklaan 97 NL-2587 BN The Hague Netherlands		State of Nationality	State of Residence
		Telephone No. 070 416 67 11	
		Facsimile No. 070 416 67 99	
		Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:			
<input type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name	<input checked="" type="checkbox"/> the address	<input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence
Name and Address OTTEVANGERS, S., U. Vereenigde Nieuwe Parklaan 97 NL-2587 BN The Hague Netherlands		State of Nationality	State of Residence
		Telephone No. 070 416 67 11	
		Facsimile No. 070 416 67 99	
		Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary: <b>Please note that the agent's company's name has changed.</b>			
4. A copy of this notification has been sent to:			
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned		
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned		
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  C. Cupello
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

## EFFICIENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

OTTEVANGERS, S., U.  
Vereenigde  
Nieuwe Parklaan 97  
NL-2587 BN The Hague  
PAYS-BAS

Date of mailing (day/month/year) 29 January 2001 (29.01.01)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference P10171PC00	
International application No. PCT/NL99/00470	International filing date (day/month/year) 21 July 1999 (21.07.99)

## 1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant      ☐ the inventor      ☐ the agent      ☐ the common representative

Name and Address STICHTING DIENST LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK Bornsesteeg 53 NL-6708 PD Wageningen Netherlands	State of Nationality NL	State of Residence NL
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person      ☐ the name      ☐ the address      ☐ the nationality      ☐ the residence

Name and Address PEPSCAN SYSTEMS B.V. Edelhertweg NL-8200 AB Lelystad Netherlands	State of Nationality NL	State of Residence NL
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

## 3. Further observations, if necessary:

## 4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer R. Chrem
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

RECEIVED  
MAY 14 2001  
TECH CENTER 1600/2900

PCT/NL00/00470

# PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 09 April 2001 (09.04.01)	
International application No. PCT/NL00/00470	Applicant's or agent's file reference M/XJ53/3Twist.
International filing date (day/month/year) 03 July 2000 (03.07.00)	Priority date (day/month/year) 02 July 1999 (02.07.99)
Applicant VANDAMME, Paul et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
01 February 2001 (01.02.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

RECEIVED

MAY 14 2001

TECH CENTER 1600/2900

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Pascal Piriou Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---



PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification <sup>7</sup> :</b> <b>G01N 33/545, B29C 41/12, B42D 15/00</b>		<b>A1</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 00/05584</b>
			<b>(43) International Publication Date:</b> 3 February 2000 (03.02.00)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/NL99/00470 <b>(22) International Filing Date:</b> 21 July 1999 (21.07.99) <b>(30) Priority Data:</b> 1009703 21 July 1998 (21.07.98) NL <b>(71) Applicant (for all designated States except US):</b> STICHTING DIENST LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK [NL/NL]; Bornsesteeg 53, NL-6708 PD Wageningen (NL). <b>(72) Inventor; and</b> <b>(75) Inventor/Applicant (for US only):</b> PUIJK, Wouter, Cornelis [NL/NL]; Schoener 4340, NL-8243 VZ Lelystad (NL). <b>(74) Agent:</b> OTTEVANGERS, S., U.; Vereenigde Octrooibureaux, Nieuwe Parklaan 97, NL-2587 BN The Hague (NL).			<b>(81) Designated States:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Published</b> <i>With international search report.</i> <i>Before the expiration of the time limit for amending the</i> <i>claims and to be republished in the event of the receipt of</i> <i>amendments.</i> <i>In English translation (filed in Dutch).</i>
<b>(54) Title:</b> METHOD FOR MANUFACTURING A CARRIER FOR CHEMICAL OR BIOCHEMICAL ASSAYS			
<b>(57) Abstract</b>  Method for manufacturing a preparation carrier, in particular suitable for use in chemical and biochemical research, wherein: on at least one surface of a carrier base, a layer of plastic is provided, wherein the plastic layer is treated thermally and/or chemically, such that the surface roughness of the side of the plastic that faces the carrier base is reduced, while it does not adhere to the carrier base, whereupon the plastic is removed from the carrier base, with the released, relatively smooth surface of the plastic forming a carrier surface.			

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						

## METHOD FOR MANUFACTURING A CARRIER FOR CHEMICAL OR BIOCHEMICAL ASSAYS

The invention relates to a method for manufacturing a preparation carrier, in particular suitable for use in chemical and biochemical research.

In biochemical research, use is typically made of so-called miniwells in for instance microtiter plates, wherein into each miniwell, a small amount of preparation to be assayed is introduced, treated and observed. By means of markers, it can then be established whether particular bindings have taken place in the relevant miniwells, whereby the nature of the preparation to be examined can be determined.

Such method has the advantage that a uniform distribution of the preparation can be obtained, as a result of which different assays can be performed simultaneously on the same preparation and/or the same assays can be performed on different preparations. However, such method has the drawback that the minimum volume of a miniwell is relatively large, for instance about 3 microliter, which means that relatively much preparation is required for performing the different assays, while, moreover, only a limited number of microwells can be provided on a specific surface. This means that such a method requires relatively much space on a preparation carrier.

There is further known a method wherein use is made of pins on which a preparation to be assayed is provided, which pins can subsequently be dipped in fluids included in the

well of a microtiter plate, such that bindings may or may not take place between the preparation to be assayed and the fluids in the different wells. Such a method, too, has the drawback that for a relatively small number of preparation parts to be examined, a preparation carrier having a relatively large surface is required.

The microtiter plates and pins, used in the above method, can be manufactured from plastic, for instance polyethene, which plastic may or may not be provided with a reactive substance, such that specific bindings thereto are possible. The plastic used has a relatively slight flatness. The local flatness is considerably less than the local flatness of, for instance, a glass or mica surface. In this context, 'local flatness' should be understood to mean flatness of a relatively small surface, for instance in the order of square micrometers. This means that elements from the preparation bound thereto, provided with a marker, are relatively difficult to perceive, in particular because a microscope or photographic apparatus to be employed for the analysis thereof cannot be properly focused thereon. Indeed, due to the relatively high roughness of the surface on which the elements are bound, these elements will be staggered relative to each other, viewed in a direction at right angles to the relevant surface, which complicates focusing thereon. This means that the frontal surface of each well or pin to be analyzed should be relatively large to have sufficient distinctiveness. This impedes further scaling down.

The object of the invention is to provide a method of the type described in the preamble, in which the drawbacks mentioned of the known methods are avoided, while the advantages thereof are maintained. To that end, a method according to the invention is characterized by the features of claim 1.

The advantage achieved by providing a preparation carrier having a particularly flat plastic carrier surface, suitable for binding the desired elements in a preparation, is that elements that are to be detected particularly close together can be bound while they can nevertheless be distinguished from one another by, for instance, a microscope or a CCD-camera or a like apparatus.

In principle, plastic is a favorable material for manufacturing preparation carriers, in that it is relatively simple to process and is relatively strong, while a proper binding thereto of different preparations, in particular biochemical preparations such as viruses, antigens, peptides and the like, can be effected.

Surprisingly, it has now been found that by a method according to the present invention, a smooth plastic surface can be obtained such that it is actually suitable, or at least much better suitable, as carrier surface for preparations in such examination. Indeed, by forming the plastic layer, treated thermally or chemically, against a surface of a carrier base with a suitable surface roughness, it appears that the surface roughness of the surface lying

against the carrier base can thereby be reduced considerably. Thus, for instance, a reduction of the surface roughness by a factor of 5-20 or more can be realized. This means that elements of a preparation that are bound to the carrier surface can have particularly small dimensions, while the presence thereof can nevertheless be optimally established therewith on the basis of, for instance, markers bound thereto. On a small carrier surface obtained by a method according to the invention, many different or identical elements can be distinguished close together. This can for instance be effected by applying drops of from 0.25 to 0.5 nl to the surface. In a preferred embodiment, these drops are applied by a printer, in particular a printer of the inkjet or bubblejet type or a like, preferably piezoelectrically controlled printer. Such printers are known per se. The use thereof for manufacturing (bio)chemical preparations is particularly advantageous in that a precise positioning and dosing can be obtained at high speed and reproducibility.

Moreover, particularly small wells can also be filled thereby, for instance in the order of magnitude of 0-3  $\mu$ l, more in particular between 0 and 0.1  $\mu$ l. Preferably, in a method according to the invention, such wells have said reduced surface roughness, yet in assays utilizing, for instance, fluorescence markers or the like, the inner surface of the wells may also be of rougher design, for instance of the normal roughness of PE.

In a particularly advantageous embodiment, a method according to the invention is characterized by the features of claim 2.

By at least partially melting the plastic against a surface of the carrier base, an optimal distribution of the plastic can be effected in a particularly simple manner. Moreover, in that case, for instance plastic film or sheet can readily be started from. However, it is also possible to cause for instance polymerization of the plastic layer to take place on the carrier surface, or to chemically treat the plastic such that deliquescence against the surface of the carrier base occurs.

Without wishing to be bound to any theory, the particular smoothness of the obtained carrier surface seems to result at least partly from the use of a particularly smooth carrier base and the absence of adhesion to the carrier base. Hence, it seems that a method according to the present invention can be optimized by using a carrier base having an optimal smoothness and the absence of adhesion between the plastic and the carrier base. However, also with sub-optimal conditions, sufficiently smooth carrier surfaces can already be obtained.

In a first preferred embodiment, a method according to the invention is further characterized by the features of claim 3.

The use of a plastic having at least one active group for the relevant preparation offers the advantage that the

desired binding groups can directly be obtained. A group suitable for forming amino groups coupled to the carrier surface offers the advantage that such preparation carrier is in particular suitable for use in biotechnology, more in particular for binding amino acids.

In an alternative embodiment, a method according to the invention is characterized by the features of claim 4.

When the plastic used is not directly, or at least not sufficiently suitable for binding the relevant preparation, or at least cannot be transformed therefor by linkers, it is preferred that the carrier surface be treated in such a manner that on, or at least in the carrier surface, one or more active groups for the relevant preparation be provided, again in particular groups for forming amino groups by means of linkers, such as a -COOH or a -COO-methyl group. The advantage thus achieved is that as plastic for the carrier surface, a material can be used having particularly suitable properties therefor, such as, for instance, polyethene, while the treatment of the carrier surface provides that the formation of the amino groups is yet effectively enabled. In this respect, the advantage of plastic over, for instance, mica and glass, is that such treatment is possible in a particularly simple and effective manner, while in each case a suitable treatment can be selected, depending on the preparation to be bound. In particular -COOH groups actually also enable direct or indirect binding of, for instance,



viruses and the like, while other active groups can also be provided, for instance  $\text{-NH}_2$  groups.

In further elaboration, such method is preferably characterized by the features of claim 5.

5 By grafting the carrier surface with a plastic, a carrier surface that in itself binds insufficiently, if at all, can readily be treated for obtaining the desired activity. Especially the use of acrylic acid or methyl acrylate is particularly suitable therefor.

10 In a further advantageous embodiment, a method according to the invention is further characterized by the features of claim 6.

Surprisingly, it has been found that as the case may be, the surface roughness of a carrier surface can be further  
15 reduced by introducing  $\text{-NH}_2$  groups in, or at least on the carrier surface. Thus, the surface roughness of a polyethene treated with acrylic acid or methyl acrylate can for instance be reduced thereby such that it can as yet be rendered suitable, or at least better suitable, for the desired use.

20 In further elaboration, a method according to the invention is further characterized by the features of claim 7, preferably by the features of claims 7 and 8.

By contacting a solution of a suitable monomer with the carrier surface and subsequently treating the plastic and  
25 solution, such that polymerization of at least a portion of the monomer occurs, a thin so-called adhesive layer can be provided on the carrier surface in a particularly simple

manner, which adhesive layer is properly capable of effecting the desired bindings. By means of suitable irradiation, this polymerization can be effected and checked in a particularly effective manner.

5           Particularly suitable as carrier base are surfaces formed from, for instance, mica or glass, or materials having comparable surface roughness, hardness and/or porosity. In particular glass proves to be particularly suitable therefor.

          Preferably, during use of a preparation carrier  
10 according to the present invention, a liquid is applied to the surface in a number of separate spots, each spot having a specific surface area. In each spot, one or more assays can be performed. By regulating the thickness of the adhesive layer, the size of each spot can be determined. Surprisingly,  
15 it has been found that with a relatively thin adhesive layer with a specific amount of liquid, a smaller spot is obtained than with the same amount of liquid with a thicker adhesive layer. Without wishing to be bound to any theory, this seems to result from the suction action of the adhesive layer, at  
20 least from deliquescence of the liquid which is greater with a relatively thick adhesive layer. By way of illustration, with an amount of liquid per spot of about 0.25 nl, with an adhesive layer having a thickness of from 1 to a few atoms, a spot can be obtained having a section of, for instance, 0.1  
25 mm or less, while with an adhesive layer having a considerably greater thickness, spots can be obtained having a section of, for instance, 5 mm or more. These amounts and

dimensions should not be construed as being limitative in any way.

With a method according to the invention, it is also possible to provide wells in a surface having the desired surface roughness through the use of, for instance, glass or mica bars having a spherical end that is pressed into the surface of the heated material, such as PE, preferably a matrix of such balls, pins or the like. As a result, each well is formed with an inner surface having said local low roughness. With such method, for instance wells having a volume of less than 3  $\mu\text{l}$ , more in particular less than 1  $\mu\text{l}$ , for instance 0.1  $\mu\text{l}$  or less, can be obtained, into which drops of a particularly small volume can be deposited by means of jet printer technique or the like.

In a further elaboration, a method according to the invention is further characterized by the features of claim 10.

Coupling information-carrying polymers to the carrier surface offers the advantage that post-treatment of the surface is readily possible without the information-carrying polymers coming loose therefrom unintentionally, so that after said treatment, these polymers can readily be examined. If necessary, linkers can be used for the coupling of the polymers, whereby binding can be simplified, while the selectivity can be further increased for causing only the desired bindings to be effected or at least left over.

The invention further relates to preparation carrier, characterized by the features of claim 14.

Precisely a preparation carrier having a carrier surface manufactured from plastic, with a surface roughness such that markers of biochemical elements adhered thereto are perceptible and locatable thereon, offers the advantage that such preparation carrier is particularly simple to manufacture and adjust to the preparations to be examined, while such preparation carrier can be used in a very simple manner, in particular also because it is relatively strong. The carrier surface being suitable for specific binding of the preparation, the advantage achieved is that during use, non-bound elements of the preparation can readily be washed away or treated otherwise, readily enabling all kinds of assays, known per se, to be performed on the preparation, such as ELISA. Precisely the specific binding of elements from the preparation to specific active groups of the carrier surface makes these assays possible. The particular flatness of the carrier surface offers the advantage that a particularly high information density can be obtained. The elements in the preparation that are to be examined can be positioned very close together without being indistinguishable.

In further elaboration, a preparation carrier according to the invention is further characterized by the features of claim 18.

-COOH groups and -COO-methyl groups in or at least on the surface readily enable formation of amino groups on the carrier surface by means of linkers, which groups are in particular suitable for coupling amino acids thereto. This  
5 offers the advantage that in a simple manner optionally presynthesized, complete or incomplete peptides, pieces of PNA, pieces of DNA, sugars, other organic molecules, proteins, viruses, bacteria and cells can be coupled to the surface, to the -COOH group, the -COO-methyl group or the  
10 formed amino group. For that matter, other active groups can be used as well. Thus, for instance bromoacetic acid can be synthesized on the carrier surface, to which peptides can subsequently be coupled via an SH-group of the peptides in question.

15 Hence, a preparation carrier according to the present invention offers the advantage that a great variety of possible chemical bindings of elements to the carrier surface can be obtained, as a result of which the preparation carrier is almost universally applicable.

20 The invention further relates to the use of microscopy and/or photography for biochemical research, characterized by the features of claim 20.

Precisely the use of a preparation carrier according to the present invention in cooperation with a microscope or  
25 a photo apparatus is advantageous, because the particular flatness of the carrier surface of the preparation carrier provides that in each case a proper focusing can be effected,

so that particularly small color areas or other types of markers can readily be detected and distinguished from one another. Accordingly, in contrast with the known method, a particularly large number of markers can be distinguished on  
5 a relatively small surface, preferably involving the use of a confocal microscope scanner or a like microscope.

The invention further relates to the use of a printer for applying preparation to be examined to a preparation carrier according to the invention, characterized by the  
10 features of claim 21.

Printers, in particular a printer of the inkjet type, bubblejet type or comparable printers, operating by a drop-on-demand technique, such as for instance a printer having a glass capillary from which liquid is dropwise jetted in very  
15 small "drops" under the influence of a deformation of the wall by means of a piezoelectric element, offer the advantage that thus, in a relatively quick manner and with a high accuracy and reproducibility, small to particularly small amounts of slightly liquid preparation can be applied to a  
20 carrier surface in particularly closely spaced, distinct positions. If necessary, conjugates can thereby be added as well. In this manner, preparation carriers can simply and quickly be made ready for examination, while particularly much information can be applied to relatively small  
25 preparation carriers. This renders treatment and analysis of the information on the preparation carriers possible in a particularly simple manner.

The invention moreover relates to a microtiter plate or a like preparation carrier, comprising a matrix of wells, characterized by the features of claim 22.

Such preparation carrier is in particular suitable for use with a printer as described in claim 20. The advantage thus achieved is that the surface tension of the liquid to be introduced into the wells can be quickly and unequivocally introduced into the wells and the risk of air inclusion is prevented. Thus, for instance drops of a few tenths of  $\mu\text{l}$  or nl or less can be used. As a result, even less preparation and less surface are required. Preferably, yet not necessarily, the wells have an inner surface of a relatively low smoothness, obtained by a method according to any one of claims 1-13.

Preferably, such preparation carrier has outside dimensions of about 2.5 times 7.5 cm, allowing it to be placed in a standard detection apparatus, suitable for microscope slides.

Further exemplary embodiments of methods and preparation carriers according to the invention are given in the further subclaims.

To clarify the invention, exemplary embodiments of a method and a preparation carrier will hereinafter be specified with reference to the accompanying drawings. In these drawings:

Fig. 1 shows a carrier base;

Fig. 2 shows a carrier base with a plastic layer applied thereto;

Fig. 3 shows the plastic layer removed from the carrier base;

5 Fig. 3a shows a plastic layer according to Fig. 3, in an alternative plastic;

Fig. 4 shows the plastic layer with adhesive layer grafted on the carrier surface;

10 Fig. 5 is a schematic representation of a preparation carrier with peptides adhered to the carrier surface;

Fig. 6 is a much enlarged representation of, respectively, the surface of a customarily used pin, the surface of mica, the surface of a carrier surface according to present invention, manufactured from polyethene, and the  
15 surface of glass;

Fig. 7 shows four surfaces according to the present invention, with the carrier surface being grafted with a layer of methyl acrylate;

20 Fig. 8 shows four surfaces of a carrier surface according to the present invention, grafted with polyacrylate;

Fig. 9 is a schematic representation of a pepscan on a carrier surface; and

25 Fig. 10 shows a carrier base with a plastic layer applied thereto, comparable with Fig. 2, for the formation of a microtiter plate having a matrix of wells.



In this specification, identical or corresponding parts have identical or corresponding reference numerals. Further, as an example in this specification, unless otherwise indicated, a preparation carrier suitable for forming, on a carrier surface thereof, amino groups is started from, manufactured from treated polyethene or polypropene melted against glass. However, it will be understood that other plastics and another carrier base can be used as well, for instance a carrier base of mica and a polycarbonate, acrylic acid or methyl acrylate as plastic for the preparation carrier proper. In particular the last-mentioned plastics can offer the advantage that -COOH or -COO-methyl groups are directly available thereon. Polyethene and polypropylene are relatively inert. However, they offer the advantage of being relatively hard and strong without being brittle. Moreover, other plastics can readily be grafted thereon.

In this specification, in each case a relative flatness measure will be used, the maximal height (Z-axis) of projections above a nominal reference plane being given as percentage of one of the horizontal measures (X-axis) of the scanned surface. In this specification, this horizontal measure is in the order of magnitude of 2000-4500 nanometer. The measure for flatness V is therefore expressed in the following formula:

$$\frac{Z-axis}{X-axis} \times 100\%$$

Examples of the flatness V of materials:


- mica: V = 0.1% (Fig. 6b);
- 5 - glass: V = 0.3% (Fig. 6d);
- high-molecular polyethene: V = 10% (Fig. 6a);
- polyethene film: V = 3% (Fig. 6b); and
- a polyethene face formed according to the invention,  
V = 0.6% (Fig. 6c);
- 10 - polyethene pin surface: V  $\cong$  28%.


These dimensions and values are given only as an example and should not be construed as being limitative in any way.

15 Legend: In the drawing:

□ = -COOH or -COO-methyl

○ = -NH<sub>2</sub>

 = antibody

 = peptide

20 ○ = marker

Fig. 1 is a sectional side elevation of a carrier base 2, formed from mica, having a top surface 4 with a flatness V of about 0.1%. Hence, this means that on the face 4, there are unevennesses of a maximal height in the Z-direction measured above the nominal face N of at the most a few

25

nanometers, for instance 4-5 nanometer. Hence, the surface 4 of mica is particularly flat. The surface 4 is for instance rectangular, with outer dimensions of 25 x 25 millimeter. The base carrier 2 has a thickness of, for instance, 0.5  
5 millimeter.

In the condition shown in Fig. 2, a plastic layer 6 is provided on the smooth top surface 4 of the base carrier 2. In the embodiment shown, this is a polyethene film having an inherent smoothness of about 3%. The film layer has a  
10 thickness of, for instance, 0.035 millimeter.

The film layer 6 and/or the base carrier 2 are heated such that at least the side of the plastic layer 6 facing the surface 4 melts and deliquesces on the surface 4, after which the whole is cooled. Between the glass base carrier and the  
15 plastic layer 6, no adhesion of any significance will occur, allowing the plastic layer 6 to be readily removed from the base carrier 2 again. Surprisingly, it has been found that the surface 8 of the plastic layer 6 that faced the base carrier 2 has obtained a flatness V which is considerably  
20 better than the flatness V of the polyethene film used. The flatness of the carrier surface 8 is for instance about 0.6% when no further special measures are taken. It is further observed that, as the case may be, deliquescence of at least the part of the plastic layer 6 facing the base carrier 2 can  
25 also be effected, or at least partially effected, by for instance a chemical reaction.

Fig. 3 shows a preparation carrier 1 formed according to the present invention, with the carrier surface 8 facing upwards. In the embodiment shown, for instance polyethene or polypropene is used as plastic, which is relatively inert. As a result, binding thereto of biochemical elements is in fact not possible. Fig. 3A shows an alternative embodiment, wherein, as plastic layer 106, a plastic is used containing active groups 112, symbolically represented by spheres placed on rods. Such a plastic can for instance be a polycarbonate, an acrylic acid or methyl acrylate, in which for instance -COOH or -COO-methyl groups are present as active groups 112, in the drawing symbolically represented by, respectively, a square and a sphere on a rod.

Fig. 4 shows a preparation carrier 1 having a plastic layer 10 grafted thereon, for instance a polymerized layer of acrylic acid or methyl acrylate. Such layer 10 can be applied to the plastic carrier layer 6 of polyethene or another plastic as follows.

The plastic part 6 is immersed with its smooth carrier surface 8 in a solution of a monomer with a specific concentration, after which the solution with the plastic included therein is irradiated with radioactive radiation of a specific intensity, such that at least on the carrier surface 8 polymerization of the relevant monomer occurs.

Suitable monomer solutions are, for instance, a 0.6% or 6% acrylic acid (AC) monomer solution or a 0.6% or 6% methyl acrylate (MA) monomer solution. These solutions can

for instance be irradiated with  $\gamma$ -radiation of, for instance, 2 or 12 kilo Gray (kGy). By a suitable choice of the irradiation time, a desired thickness of the relevant polymerized layer is thereby obtained on and partially in the carrier surface 8. Such adhesive layer has a thickness of for instance a few molecules or chains, so that the flatness of the carrier surface 8 is preserved as much as possible or even further increased.

Figs. 7 and 8 show eight preparation carriers according to Fig. 4, grafted in solutions of, respectively, monomers methyl acrylate (Fig. 7) or acrylic acid (Fig. 8) with different concentrations and different irradiation amounts. As appears from Fig. 7, in particular the surfaces shown in Figs. 7c, 7d and 7h are particularly flat and hence extremely suitable for preparation examination. The coding successively gives the carrier plastic (PE), the concentration of the solution (in %), the amount of irradiation (in kGy) and the grafting plastic (AC or MA) used. Of course, other combinations are also possible, for instance more or fewer or other monomers, other exposure amounts, other polymerization methods and other carrier plastics. Suitable choices therefrom are directly clear to anyone skilled in the art and can be determined without further invention.

A preparation carrier manufactured according to the invention can be utilized as follows.

By means of EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide) the peptide AC-SDSSFFSYGEIPFGK is applied to the carrier surface, coupled to an active group 12. Next, an ELISA is performed thereon with a monoclonal antibody (mAb) 59.7 (1/10,000) before and after disruption in an disrupting buffer. For this purpose, the carrier surface is cleaned ultrasonically at 70° in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) and beta-mercaptoethanol (BME). The results of this ELISA are given in Table 1. It is clearly shown that on the carrier surface grafted with plastic (acrylic acid), the peptide is coupled, since after disruption, binding of the monoclonal antibody is still possible, while after disruption this is no longer possible at the bare carrier surface 8. It has been found that especially the grafted plastics (0.6/12Ac) and (0.6/2Ac) yield particularly satisfactory results.

Presynthesized complete peptides, as well as pieces of PNA, pieces of DNA, sugars or complete complex organic molecules, proteins, viruses, bacteria and cells can be coupled to a carrier surface of a preparation carrier according to the present invention. In principle, these can be coupled to the carrier surface as well as to amino groups formed on the carrier surface by linkers to the -COOH or -COO-methyl groups. Also, for instance bromoacetic acid can be coupled to an NH<sub>2</sub> group for obtaining a bromo group. To this bromo group, a peptide can be coupled via an SH group thereof. This may be advantageous in terms of price. A thus

formed and treated preparation carrier can be observed with, for instance, a confocal microscope scanner. With this, a good view can be obtained of a relatively large surface, compared with for instance digitally stored comparison material.

In another application of a preparation carrier according to the present invention, viruses or antibodies are bound directly or via linkers with active groups 12 on or at least in the carrier surface 8.

The viruses or antibodies to be bound have or are provided with active groups, for instance -COOH groups and/or -NH<sub>2</sub> groups, which can be coupled directly or via linkers to the active groups 12 on or at least in the carrier surface 8, 10. Thus, for instance -NH<sub>2</sub> groups of a virus can be coupled to a -COOH group or an -NH<sub>2</sub> group of the carrier surface 8, 10, while -COOH groups of a virus can for instance be coupled to -NH<sub>2</sub> groups of the carrier surface 8, 10. As linkers, different chemicals can be used, for instance HMDA (Hexamethylenediamine) or EDA (Ethylenediamine). Thereby, for instance -NH<sub>2</sub> groups can be introduced as active groups in or on a carrier surface 8, 10 which only or substantially comprises for instance -COOH groups as active groups 12. HMDA can be used by coupling of Boc HMDA (Butyloxycarbonylhexamethylenediamine) via DCC (Dicyclohexylcarbodiimide) to the -COOH groups, whereby, after Boc-deprotection, -NH<sub>2</sub> groups become available for the coupling of antigen. When EDA is used, a surface 8, 10


treated with methyl acrylate can subsequently be treated with said EDA for, for instance, 72 hours at 40°C, with active -NH<sub>2</sub> groups becoming available. The first carrier surfaces are for instance PE(0.6/2Ac)-Hmda and PE(0.6/12Ac)-Hmda, while  
5 the second type of surface for instance meets PE(0.6/2MA)-EDA.

The other surfaces shown in Figs. 7 and 8 are less flat. Introduction of -NH<sub>2</sub> groups into these surfaces, for instance in the manner described above, surprisingly leads to  
10 an improvement of the flatness V of these surfaces. This means that these surfaces, through the introduction of said -NH<sub>2</sub> groups therein, become also or at least even better suitable for use as preparation carrier for at least form-directed examination.

15 A further examination with a preparation carrier is globally described hereinbelow as an example and should not be construed as being limitative in any way.

Fig. 9 is a schematic representation of a pepscan examination, comprising the primary amino acid sequence of  
20 GP120 of HIV1, the main glycoprotein of HIV-1. Each circle represents an amino acid. For the amino acids, the single-letter code is used (A=alanine, C=cysteine, D=aspartic acid, E=glutamic acid, F=phenylalanine, G=glycine, H=histidine, I=isoleucine, K=lysine, L=leucine, M=methionine,  
25 N=asparagine, P=proline, Q=glutamine, R=arginine, S=Serine, T=threonine, V=valine, W=tryptophan, Y=tyrosine).



The amino acid sequence of GP120 of HIV-1 is divided into overlapping peptides as indicated. Peptide number 1 is the peptide starting with amino acid number 1 and ending with amino acid number 9, peptide number 2 is the peptide starting with amino acid number 2 and continuing to amino acid number 10, etc. The peptides are synthesized on the carrier surface, as shown in the lower part of Fig. 9. The peptides are indicated by individual triangles. Next, the complete carrier surface is brought into contact with the same antibody, represented by . Some peptides will bind to this antibody. After the solution of antibody has been washed from the carrier surface, the antibody that is still present on the carrier surface and bound by the peptides can be demonstrated by means of anti-antibody conjugate. Thus, the sequence of the peptide that has bound to the antibody can directly be determined. Markers may be provided, preferably fluorescent markers, yet other markers may also be applied, for instance radioactive markers, precious metal such as gold, color markers and the like. As appears from Fig. 9, the individual peptides are particularly closely spaced. As the carrier surface is particularly flat, these peptides, at least the markers adhered thereto, can yet be detected individually with a confocal microscope scanner. This moreover means that only very little of the different elements needed for the assay is necessary, such as the peptides to be distinguished, conjugate, antibody, anti-antibody conjugate and the like.

After the desired sequence of the or each relevant peptide has been established, the antibody can be removed from the peptides and the peptides can be reused. Through the use of a preparation carrier according to the present  
5 invention, particularly many different peptides can be synthesized in a relatively short time.

It is preferred that the peptides be applied to the carrier surface by means of an inkjet printer or a bubblejet printer or like printers that are based on the drop-on-demand  
10 technique, because this enables a particularly dense packing of the relevant peptides on the carrier surface in a simple, quick manner and with great precision and reproducibility. For instance, "drops" of from 0.25 to 0.5 nanoliter can be jetted at 1 to 2 kilohertz. The carrier plastic has the  
15 advantage of being properly resistant to the peptide chemistry, which seems to be too aggressive if glass were used as carrier. With a method according to the present invention, a very drastic microtuturization of the pepscan can be obtained. For scanning the surface with peptides and the  
20 like bound thereto, a confocal microscope is preferably used. Precisely with such a microscope, the particular smoothness of the surface has great advantages.

Table 2 shows for the eight surfaces shown in Figs. 7 and 8 ELISA values of monoclonal antibodies and their  
25 associated peptides, synthesized on the relevant carrier surfaces. This demonstrates that synthesization is possible on all grafted surfaces used, regardless of the thickness

thereof. Thus, peptides, DNA, PNA and like information-carrying polymers can be synthesized thereon.

A preparation carrier according to the present invention offers as important advantage over the prior art that in a particularly simple manner, different types of active groups can be provided on, or at least in the carrier surface, such as the -COOH groups and -NH<sub>2</sub> groups mentioned. According to the desired application and the desired bindings, the carrier surface can be treated in a suitable manner, if necessary. Moreover, the active groups can be provided so as to be particularly close together, so that a high density of the elements to be detected from the preparation can be obtained, for instance 999 peptides per cm<sup>2</sup>. Accordingly, the resolving power of the detection technique used can be increased considerably, or at least be utilized in a more optimal manner.

The flatness of the carrier surface 8 can possibly be further increased through the use of appropriate techniques, for instance vacuum techniques for placing and melting the plastic layer 6 on the carrier base 2, or at least causing it to deliquesce thereon. This prevents gas inclusions from possibly leading to unevennesses.

Fig. 10 is a sectional side elevation of a carrier base 202 having a top surface 204, on which protrusions 214 are provided, which are substantially spherical, for instance hemispheres. The convex side thereof faces away from the carrier base 202. A plastic layer 206 is provided over the

base carrier 202 and the protrusions 214, for instance as described with reference to Figs. 1 and 2. As a result, cavities 216 are obtained in the plastic layer 206, which cavities have an inner surface corresponding to the outer shape of the protrusions 214 and a surface roughness comparable therewith. The protrusions 214 can for instance be formed by glass or mica parts, such as balls pressed approximately halfway into the base carrier 202. They may also be formed integrally therewith. Thus, wells 216 are obtained, having an inner surface of a particularly low surface roughness, for instance in the order of magnitude as described with reference to Figs. 1-9. The wells are preferably arranged in a N x M matrix, comparable with known microtiter plates.

The wells 216 may have a volume corresponding to that of the wells of known microtiter plates, i.e. in the order of magnitude of, for instance, about 3  $\mu$ l. However, it is also possible to make them of a considerably smaller design, for instance with a diameter such that wells 216 are obtained having a volume which is considerably less than 3  $\mu$ l, for instance less than 1  $\mu$ l or even less than 0.1  $\mu$ l. These wells are preferably, yet not necessarily, formed with protrusions 214 having a particularly smooth outer surface. A carrier 206 having such particularly small wells 216 offers the advantage that very little preparation is necessary and a great many wells 216 can be provided on a relatively small surface. Such preparation carrier 201 is in particular suitable for use

with a printer of the drop-on-demand type, such as an inkjet or bubblejet printer or the like. Thus, particularly small volumes can be introduced into the well 216 without involving air inclusion in the well, while the surface tension of the preparation liquid to be introduced can be overcome relatively easily.

In an alternative embodiment, not shown, instead of protrusions, pins are used whose ends correspond to the protrusions 214, which pins are moved relative to the plastic layer 206 for forming the desired cavities 216. Also, in this manner, regular or other patterns of wells 216 can be obtained of the desired volume. Wells 216 of said relatively small volume (less than 3  $\mu\text{l}$ , in particular less than 1 and preferably less than 0.1  $\mu\text{l}$ ) are in particular suitable for analysis of preparations included therein, by means of for instance luminescence, fluorescence or comparable markers which can be detected without utilizing HFM microscopy.

The invention is in no way limited to the exemplary embodiments shown in the drawing and specification. Many variations thereto are possible within the framework of the invention outlined by the appended claims.

For instance, other plastics may be used for forming the carrier surface and/or for grafting the layer 10 thereon. Suitable plastics may for instance be selected on the basis of the desired active groups, the desired hardness or flexibility, the desired combination of carrier plastic and grafting plastic, possible resistance to, for instance,

chemicals, irradiation, exposure and the like. Such choices will be readily understood by anyone skilled in the art within the framework of the invention.

Further, preparation carriers according to the present invention may also be used for other examinations, for instance examinations involving the use of markers for establishing the presence of specific elements, for instance fluorescent, coloring or radiant markers. In the exemplary embodiments shown, the plastic layer is in each case provided on the base carrier, yet it is of course also possible to process a plastic layer with a sufficiently smooth surface of a base carrier that is moved against or along the surface of the plastic layer, for instance a base carrier of mica or glass. It is also possible to cause polymerization of a plastic to take place on a base carrier having the desired smoothness or to effect the formation of plastic having suitable properties thereon in a different manner. The carrier may for instance be a portion of a mold. Of course, all kinds of different preparations may be bound on a preparation carrier according to the present invention. The viruses described only serve as example.

These and many comparable variations are understood to fall within the framework of the invention outlined by the claims.

Table 1 :

OD405	Surface only flattened base polymer		Flat 0.6/2AC		Flat 0.6/12AC	
	-----		-----		-----	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
	3231	192	3502	1517	3127	2754

Table 2 :

OD405

graft type substrate polymer	peptide AcGQPAVRNE MAB 3C8 1/2000000	peptide AcSFFSYGEI MAB 57.9 1/750000
	-----	-----
6/12MA	950	590
6/2 MA	857	681
0.6/12MA	311	547
0.6/2MA	508	312
6/12AC	977	264
6/2AC	862	286
0.6/12AC	1178	875
0.6/2AC	939	1135

Especially grafts 0.6/12AC and 0.6/2AC yield good results.

Claims

1. A method for manufacturing a preparation carrier, in particular suitable for use in chemical and biochemical research, wherein:

- on at least one surface of a carrier base, a layer of plastic is provided,

- wherein the plastic layer is treated thermally and/or chemically, such that the surface roughness of the side of the plastic that faces the carrier base is reduced, while it does not adhere to the carrier base,

- whereupon the plastic is removed from the carrier base, with the released, relatively smooth surface of the plastic forming a carrier surface.

2. A method according to claim 1, wherein the plastic is provided over the at least one relevant face of the carrier base by melting said plastic at least partially.

3. A method according to claim 1 or 2, wherein as plastic, a monomer or polymer is used having at least one active group for the relevant preparation, in particular a group that can be used for forming an amino group such as a -COOH or a -COO-methyl group.

4. A method according to claim 1 or 2, wherein the carrier surface is treated such that the carrier surface comprises at least one active group for the relevant preparation, in particular a group that can be used for



forming an amino group such as a -COOH or a -COO-methyl group.

5. A method according to claim 4, wherein the carrier surface is grafted with a plastic, in particular by means of a monomer or polymer, preferably acrylic acid or methyl acrylate.

6. A method according to claim 4 or 5, wherein by introduction of -NH<sub>2</sub> groups in, or at least on the carrier surface, the surface roughness thereof is reduced.

10 7. A method according to any one of claims 4-6, wherein at least the plastic layer on at least the carrier surface is brought into contact with a solution of a monomer, whereupon the plastic and the solution are treated such that polymerization of at least a portion of the monomer occurs on the carrier surface, for which purpose, preferably, the plastic together with the solution is exposed to radiation.

15 8. A method according to claim 7, wherein the carrier surface is provided with a polymerized adhesive layer of a relatively slight thickness, preferably a thickness of at the most a few atoms or relatively flat chains.

9. A method according to any one of claims 3-8, wherein the active groups are converted into amino groups by means of linkers.

10. A method according to any one of claims 3-9, wherein information-carrying polymers are coupled or synthesized to at least a number of active groups, optionally through the agency of suitable linkers.

11. A method according to any one of the preceding claims, wherein a carrier base is used having a particularly low surface roughness of at least the face to which the plastic is applied, preferably having a surface roughness in the  
5 order of magnitude of atomic roughness or slightly thereabove.

12. A method according to claim 11, wherein a base carrier is used of which at least said face is manufactured from mica or glass or a material which is comparable therewith in  
10 respect of surface roughness, hardness and porosity, preferably from glass.

13. A method according to any one of claims 1-12, wherein the carrier surface is formed by or comprises at least one substantially spherical body having a diameter such that in  
15 the plastic, on the side facing the carrier, at least one and preferably a matrix of wells is obtained having a volume of less than 3  $\mu\text{l}$ , preferably less than 1  $\mu\text{l}$  and in particular less than 0.1  $\mu\text{l}$ .

14. A preparation carrier for use in examination of a  
20 preparation, in particular a biochemical preparation, said preparation carrier having a carrier surface manufactured from plastic, wherein the carrier surface has a surface roughness such that markers of biochemical elements adhered thereto are perceptible and locatable thereon, wherein the  
25 carrier surface is suitable for binding the preparation at least covalently.

15. A preparation carrier according to claim 14, wherein the carrier surface is formed by melting the plastic at least partially on a carrier base having a surface roughness less than or approximately equal to the surface roughness of the carrier surface.

16. A preparation carrier according to claim 14 or 15, wherein the plastic is a polymer, in particular polyethene or polypropene.

17. A preparation carrier according to any one of claims 14-16, wherein the carrier surface is grafted with a monomer or polymer, preferably acrylic acid or methyl acrylate.

18. A preparation carrier according to any one of claims 14-17, wherein the carrier surface comprises at least -COOH or -COO-methyl groups.

19. A preparation carrier according to any one of claims 14-18, wherein the carrier surface has a relatively great density and preferably a relatively regular distribution of active groups.

20. Use of microscopy and/or photography for biochemical research, wherein a preparation carrier is provided with a plastic carrier surface, preferably according to any one of claims 14-19, wherein peptides or organic molecules or portions thereof or like elements are bound to the carrier surface, wherein at least the bound elements are provided with markers, wherein the presence and position of the markers, after treatment of the preparation carrier, are

established by means of a microscope and/or photographic apparatus.

21. Use of a printer for applying, to a preparation carrier according to any one of claims 14-19, preparation to  
5 be examined, or liquid, solution and/or conjugate to be used therefor, in particular a printer of the inkjet or bubblejet type or a like printer based on drop-on-demand technique.

22. A preparation carrier, comprising a matrix of wells, in particular suitable for use with a printer according to  
10 claim 21, wherein the wells have a volume of less than 3  $\mu\text{l}$ , more in particular between 0 and 1  $\mu\text{l}$  and preferably between 0 and 0.1  $\mu\text{l}$ .

23. A preparation carrier according to claim 22, wherein the wells have an inner surface whose surface roughness is  
15 lower than that of the intermediate material.

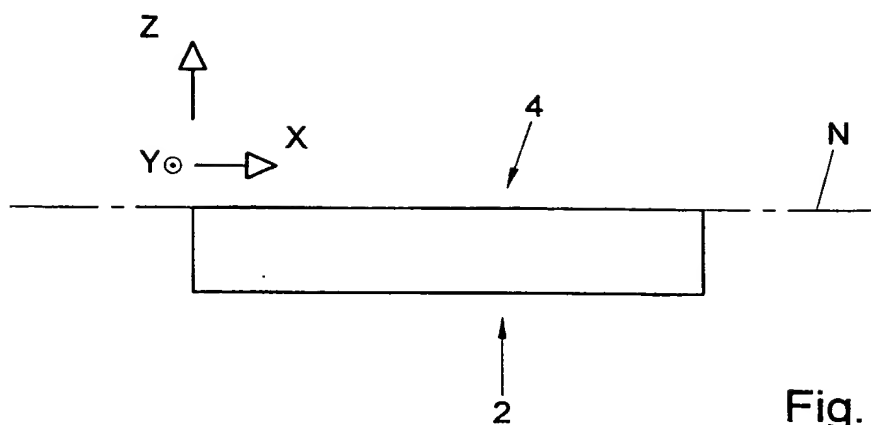


Fig. 1

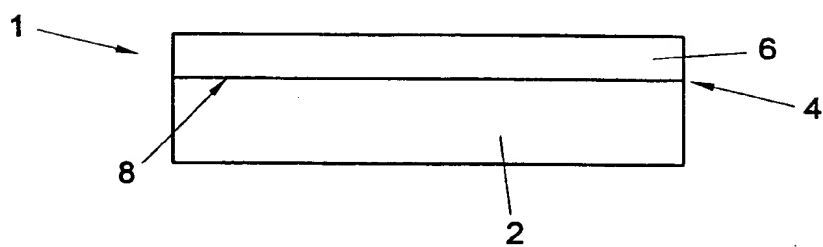


Fig. 2

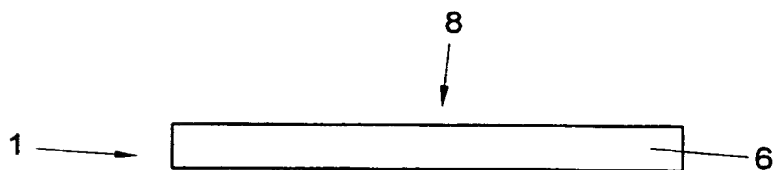


Fig. 3

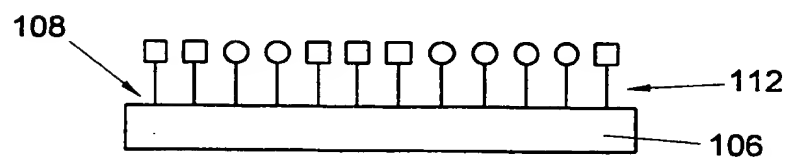


Fig. 3A

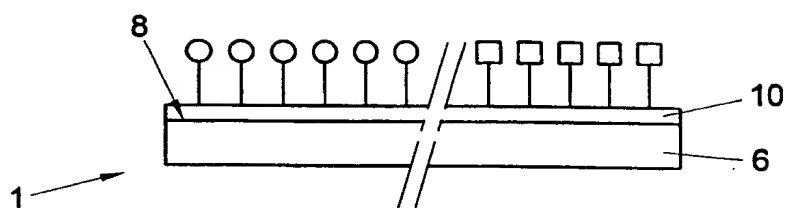


Fig. 4

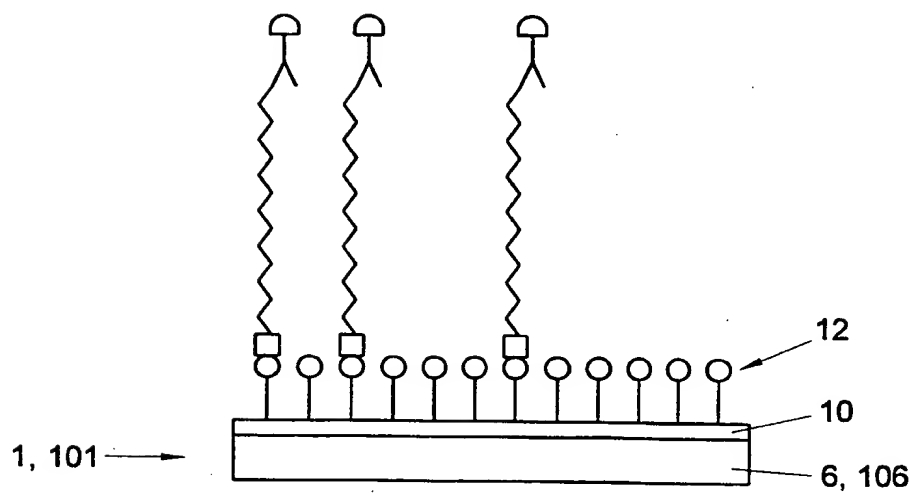
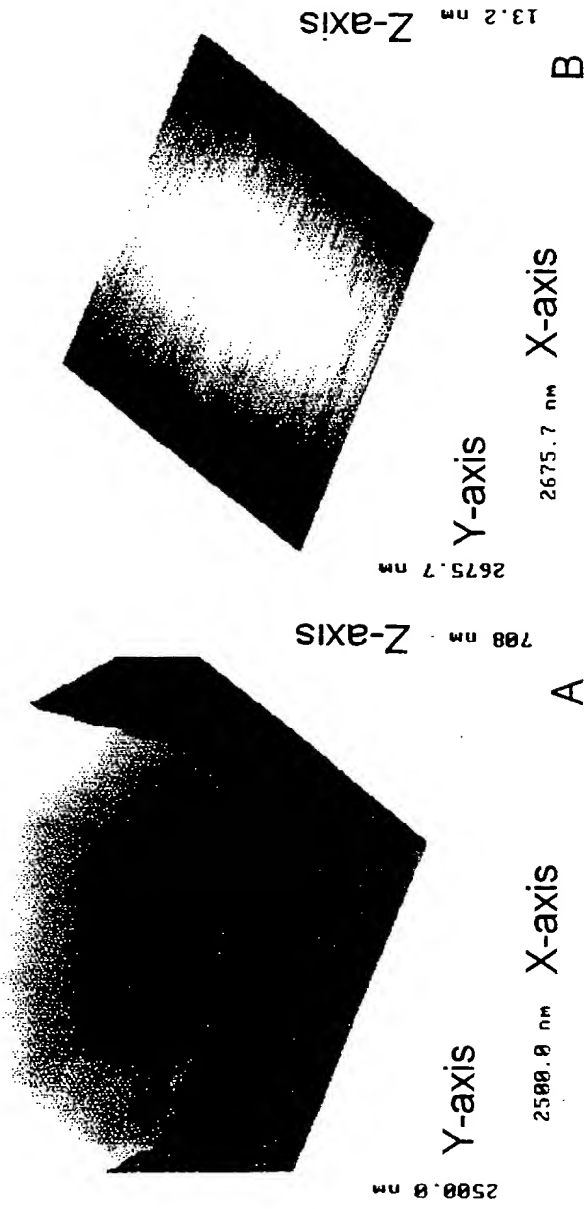


Fig. 5

Fig. 6

IDDLO209

ID-A496



IDDLO988

IDDLO884

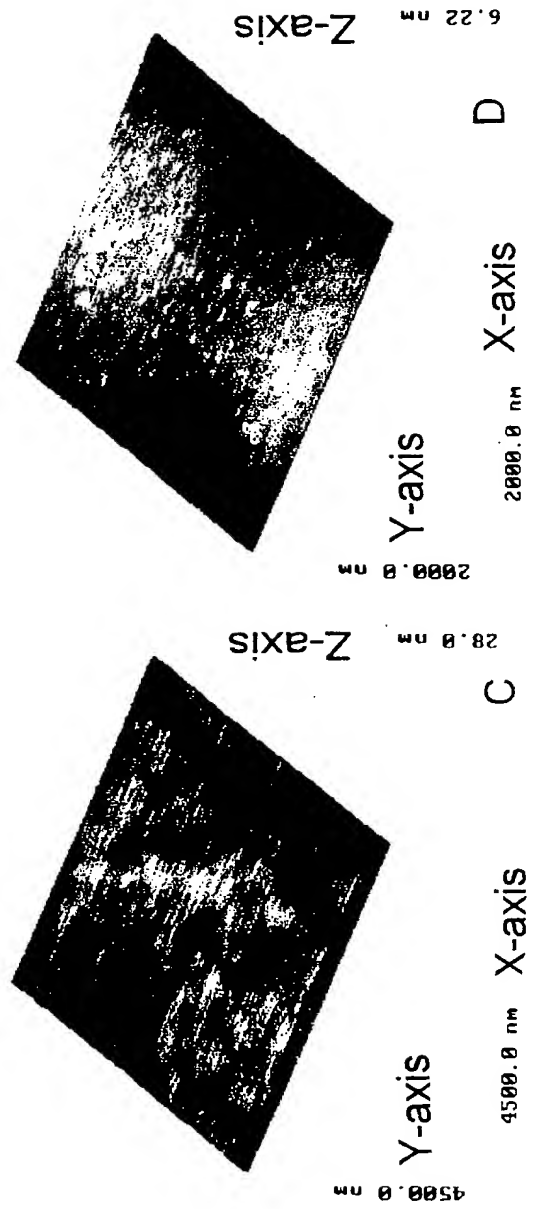
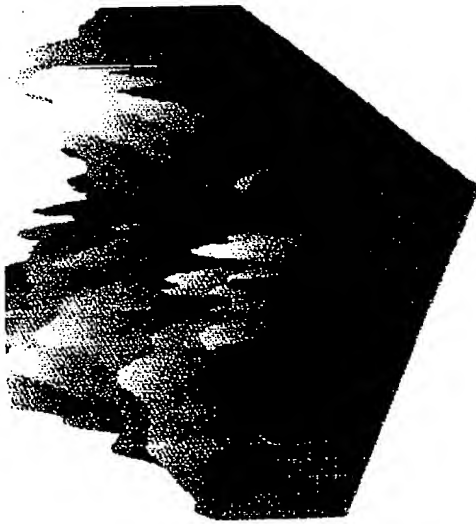


Fig. 7

1DDI0721

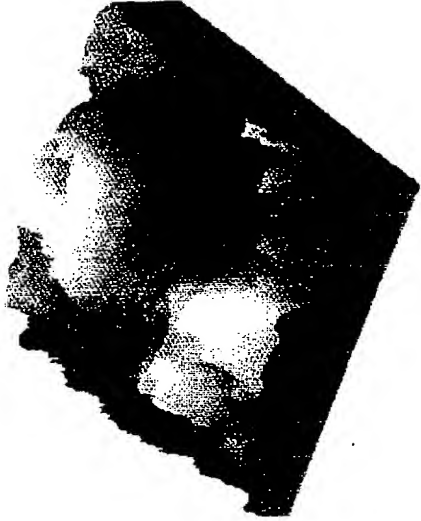


4500.0 nm  
Y-axis

4500.0 nm X-axis

A

218 nm Z-axis



4500.0 nm  
Y-axis

4500.0 nm X-axis

B

139 nm Z-axis

1DDI0726

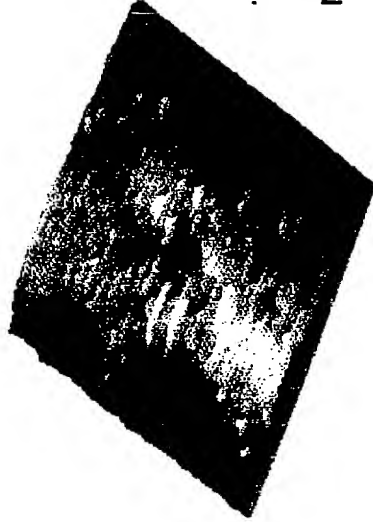


4500.0 nm  
Y-axis

4500.0 nm X-axis

C

108 nm Z-axis



4500.0 nm  
Y-axis

4500.0 nm X-axis

D

49.3 nm Z-axis



Fig. 8

1DDL0359



4500.0 nm

Y-axis

4500.0 nm X-axis

A

1DDL0363

70.7 nm Z-axis



4500.0 nm

Y-axis

4500.0 nm X-axis

B

1DDL0689

46.5 nm Z-axis



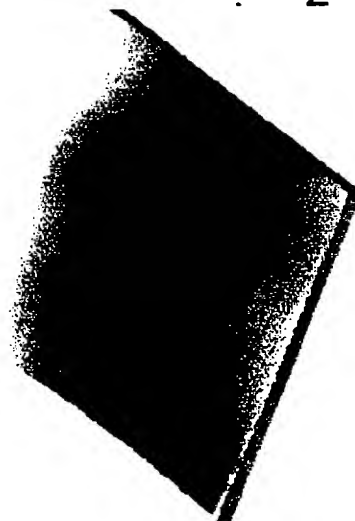
4500.0 nm

Y-axis

4500.0 nm X-axis

D

29.7 nm Z-axis



4500.0 nm

Y-axis

4500.0 nm X-axis

C

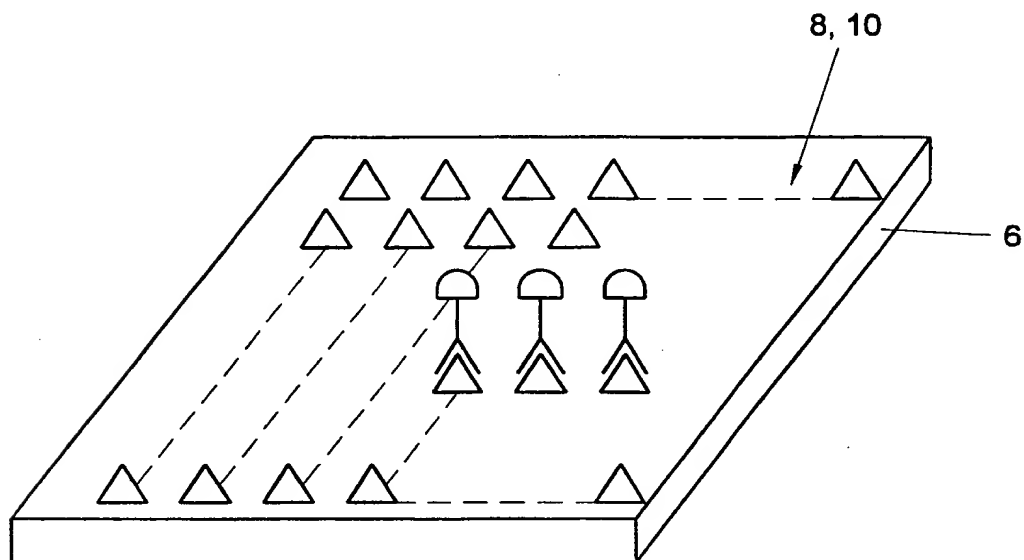
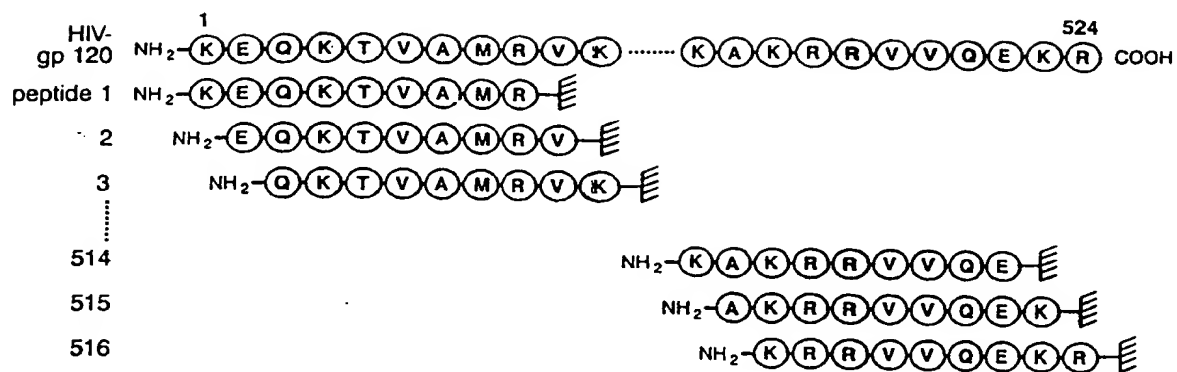


Fig. 9

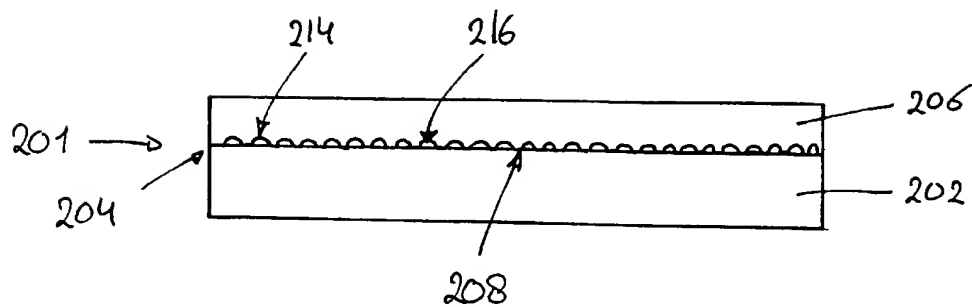


Fig 10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/NL 99/00470

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/545 B29C41/12 B42D15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N B29C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Y. WANG ET AL.: "Atomic force microscopy study of latex film formation" LANGMUIR, vol. 8, no. 3, March 1992 (1992-03), pages 760-762, XP002099997	1-5, 11-15, 17,22,23
Y	the whole document	7-10,12, 16-20
Y	--- US 5 627 079 A (J. A. GARDELLA, JR. ET AL.) 6 May 1997 (1997-05-06) the whole document	8-10, 16-20
Y	--- GB 471 882 A (ROHM & HAAS AG.) 8 June 1936 (1936-06-08) the whole document	7,12,17, 18
	--- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 November 1999

Date of mailing of the international search report

11.01.2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

GRIFFITH, G

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/NL 99/00470

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GB 641 284 A (A. BURNES ET AL.) 9 August 1950 (1950-08-09) the whole document ---	
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 8818 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A04, AN 88-124238 [18] XP002099998 & JP 63 069641 A (MITSUBISHI RAYON CO., LTD.), 29 March 1988 (1988-03-29) abstract ---	
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 9351 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A08, AN 93-410529 [51] XP002099999 & JP 05 309794 A (FUJIMORI IND. CO., LTD.) , 22 November 1993 (1993-11-22) abstract ---	
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 8911 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A05, AN 89-081149 [25] XP002100000 & JP 01 033166 A (TOA NENRYO KOGYO KK.), 3 February 1989 (1989-02-03) abstract -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/NL 99/00470

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-20, 22-23

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

1. Claims: 1-20, 22-23

Method for manufacturing a carrier, the carrier per se, and the use of microscopy and/or photography for biochemical analysis with the aid of said carrier.

2. Claim : 21

Use of a printer for the application of a sample to be analysed, or a solution and/or conjugate for use in the analytical method, to a carrier surface.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern: al Application No

PCT/NL 99/00470

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5627079 A	06-05-1997	US 5266309 A US 4946903 A	30-11-1993 07-08-1993
GB 471882 A		NONE	
GB 641284 A		US 2579138 A	18-12-1951
JP 63069641 A	29-03-1988	NONE	
JP 5309794 A	22-11-1993	NONE	
JP 1033166 A	03-02-1989	NONE	



PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

<b>PCT/NL 99 / 00 4 7 0</b>
International Application No.
21 JUL 1999 (21. 07. 99)
International Filing Date
<b>BUREAU VOOR DE INDUSTRIËLE EIGENDOM P.C.T. INTERNATIONAL APPLICATION</b>
Name of receiving Office and "PCT International Application"
Applicant's or agent's file reference (if desired) (12 characters maximum) P10171PC00

<b>Box No. I TITLE OF INVENTION</b>	
Method for manufacturing a preparation holder for chemical or biochemical assays.	
<b>Box No. II APPLICANT</b>	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)	
Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek Bornsesteeg 53 6708 PD Wageningen the Netherlands	<input type="checkbox"/> This person is also inventor.
	Telephone No.
	Facsimile No.
	Teleprinter No.
State (that is, country) of nationality: NL	State (that is, country) of residence: NL
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input checked="" type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box	
<b>Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)</b>	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)	
Puijk, Wouter Cornelis Schoener 4340 8243 VZ Lelystad the Netherlands	This person is: <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)
State (that is, country) of nationality: NL	State (that is, country) of residence: NL
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box	
<input type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.	
<b>Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE</b>	
The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: <input checked="" type="checkbox"/> agent <input type="checkbox"/> common representative	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)	
Mr Drs S.U. Ottevangers, c.s. c/o VEREENIGDE OCTROOIBUREAUX Nieuwe Parklaan 97 2587 BN The Hague the Netherlands	Telephone No. 070 - 4166711
	Facsimile No. 070 - 4166799
	Teleprinter No.
<input type="checkbox"/> Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.	

**Box No.V DESIGNATION STATES**

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

**Regional Patent**

- ☒ **AP** **ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA** **Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP** **European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA** **OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line) .....

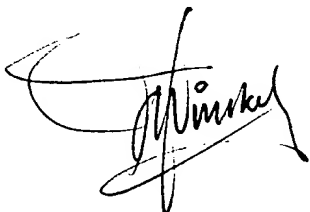
**National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):**

- |   |   |
|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AE</b> United Arab Emirates                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LR</b> Liberia                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AL</b> Albania                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LS</b> Lesotho                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AM</b> Armenia                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LT</b> Lithuania                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AT</b> Austria                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LU</b> Luxembourg                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AU</b> Australia                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LV</b> Latvia                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AZ</b> Azerbaijan                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MD</b> Republic of Moldova                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BA</b> Bosnia and Herzegovina                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MG</b> Madagascar                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BB</b> Barbados                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MK</b> The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BG</b> Bulgaria                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MN</b> Mongolia                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BR</b> Brazil                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MW</b> Malawi                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BY</b> Belarus                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MX</b> Mexico                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CA</b> Canada                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NO</b> Norway                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CH and LI</b> Switzerland and Liechtenstein  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NZ</b> New Zealand                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CN</b> China                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PL</b> Poland                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CU</b> Cuba                                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PT</b> Portugal                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CZ</b> Czech Republic                        | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RO</b> Romania                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DE</b> Germany                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RU</b> Russian Federation                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DK</b> Denmark                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SD</b> Sudan                                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>EE</b> Estonia                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SE</b> Sweden                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ES</b> Spain                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SG</b> Singapore                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>FI</b> Finland                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SI</b> Slovenia                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GB</b> United Kingdom                        | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SK</b> Slovakia                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GD</b> Grenada                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SL</b> Sierra Leone                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GE</b> Georgia                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TJ</b> Tajikistan                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GH</b> Ghana                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TM</b> Turkmenistan                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GM</b> Gambia                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TR</b> Turkey                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HR</b> Croatia                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TT</b> Trinidad and Tobago                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HU</b> Hungary                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UA</b> Ukraine                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ID</b> Indonesia                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UG</b> Uganda                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IL</b> Israel                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>US</b> United States of America                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IN</b> India                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UZ</b> Uzbekistan                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IS</b> Iceland                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>VN</b> Viet Nam                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>JP</b> Japan                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>YU</b> Yugoslavia                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KE</b> Kenya                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZA</b> South Africa                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KG</b> Kyrgyzstan                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZW</b> Zimbabwe                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KP</b> Democratic People's Republic of Korea |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KR</b> Republic of Korea                     |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KZ</b> Kazakhstan                            |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LC</b> Saint Lucia                           |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LK</b> Sri Lanka                             |   |

Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

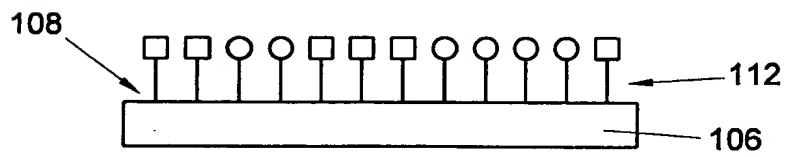
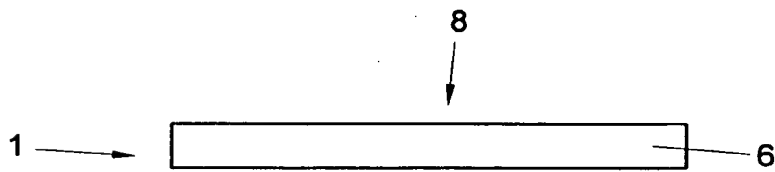
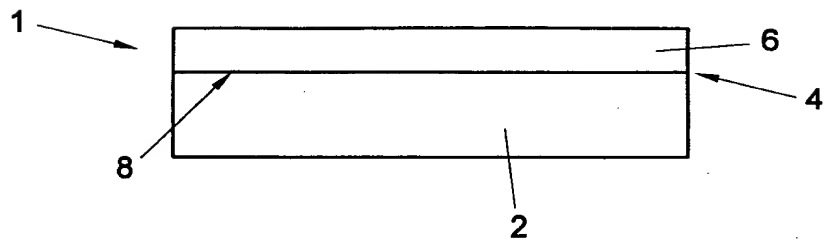
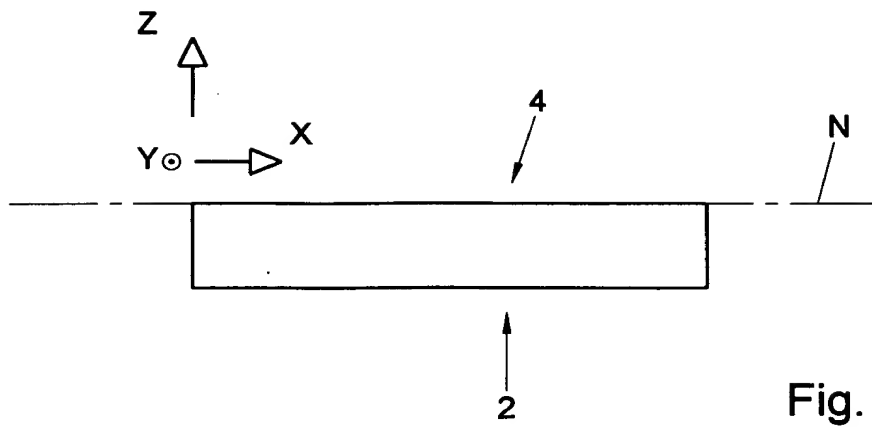
- ☐ .....  
☐ .....

**Precautionary Designation Statement:** In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM			<input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.		
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:			
		national application: country	regional application: * regional Office	international application: receiving Office	
item (1) 21 July 1998 (21.07.98)	1009703	NL			
item (2)					
item (3)					
<input type="checkbox"/> The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s)					
<small>* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.</small>					
Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY					
<b>Choice of International Searching Authority (ISA)</b> <small>(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):</small>		<b>Request to use results of earlier search; reference to that search</b> <small>(if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):</small>			
ISA / EP		Date (day/month/year)      Number      Country (or regional Office) 15 April 1999      SN 32125 NL      EP			
Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING					
This international application contains the following number of sheets: request : 3 description (excluding sequence listing part) : 23 claims : 4 abstract : 1 drawings : 7 sequence listing part of description : Total number of sheets : 38		This international application is accompanied by the item(s) marked below: 1. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet 2. <input type="checkbox"/> separate signed power of attorney 3. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any: 4. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature 5. <input type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): 6. <input type="checkbox"/> translation of international application into (language): 7. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material 8. <input type="checkbox"/> nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form 9. <input type="checkbox"/> other (specify):			
Figure of the drawings which should accompany the abstract:		Language of filing of the international application: Dutch			
Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT					
Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).					
 <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 20px;">J. H. F. Winckels</div>					

For receiving Office use only			
1. Date of actual receipt of the purported international application:		2. Drawings:	
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:		<input checked="" type="checkbox"/> received:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		<input type="checkbox"/> not received:	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.		

For International Bureau use only	
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:	18 AUGUST 1999 (18.08.99)



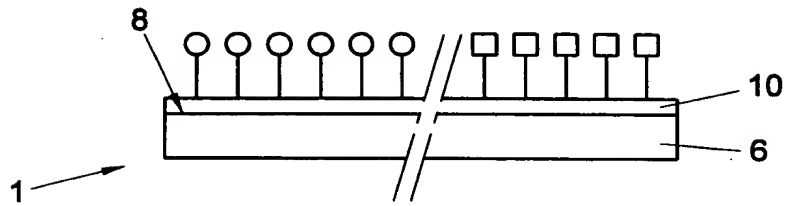


Fig. 4

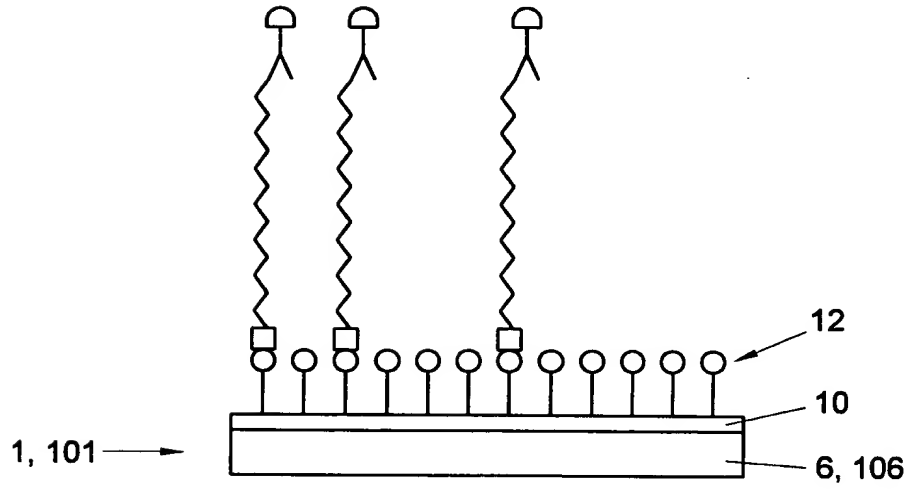
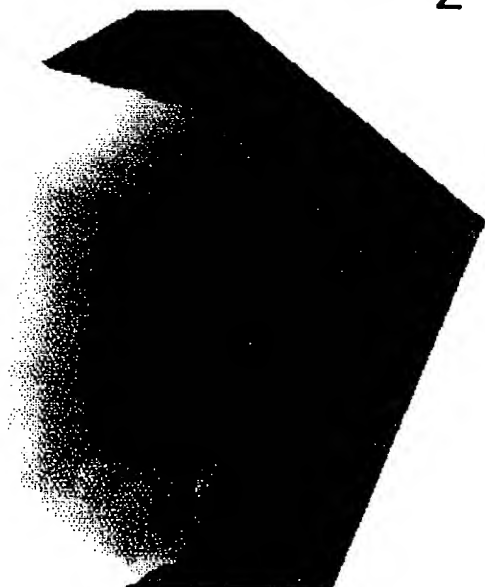


Fig. 5

ID-0496

IDDLO209



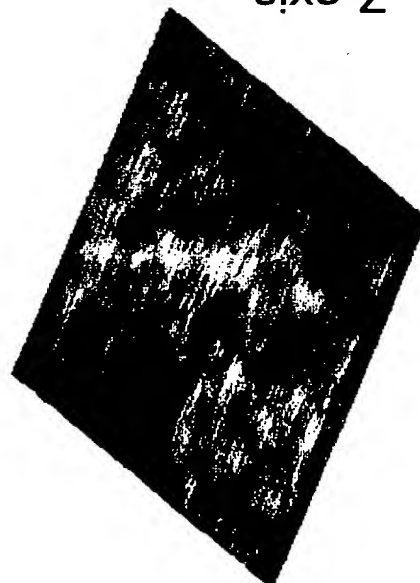
2500.0 nm

Y-axis

2500.0 nm X-axis

A

IDDLO884

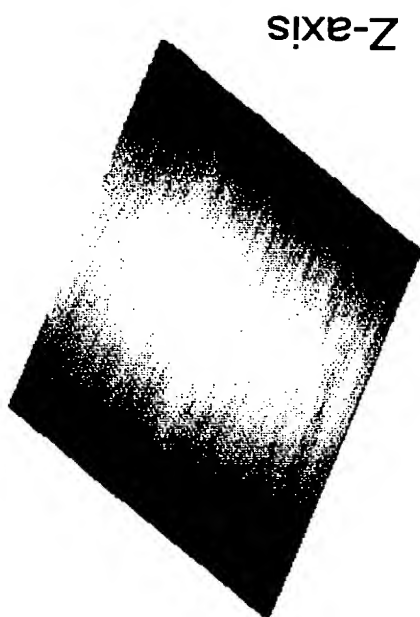


4500.0 nm

Y-axis

4500.0 nm X-axis

C



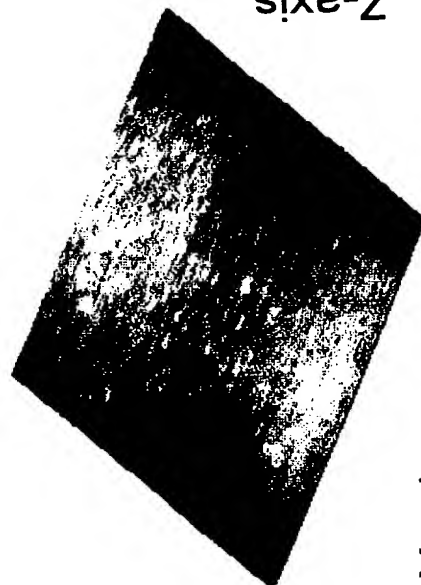
2675.7 nm

Y-axis

2675.7 nm X-axis

B

IDDLO988



2000.0 nm

Y-axis

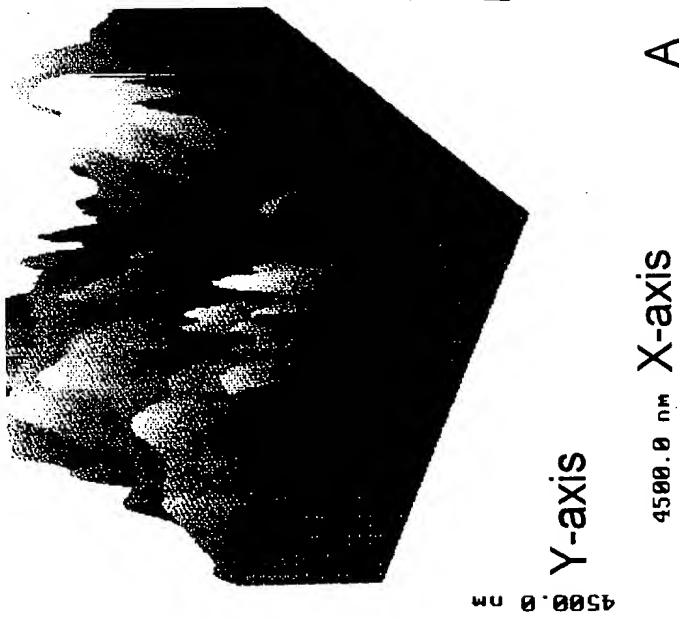
2000.0 nm X-axis

D

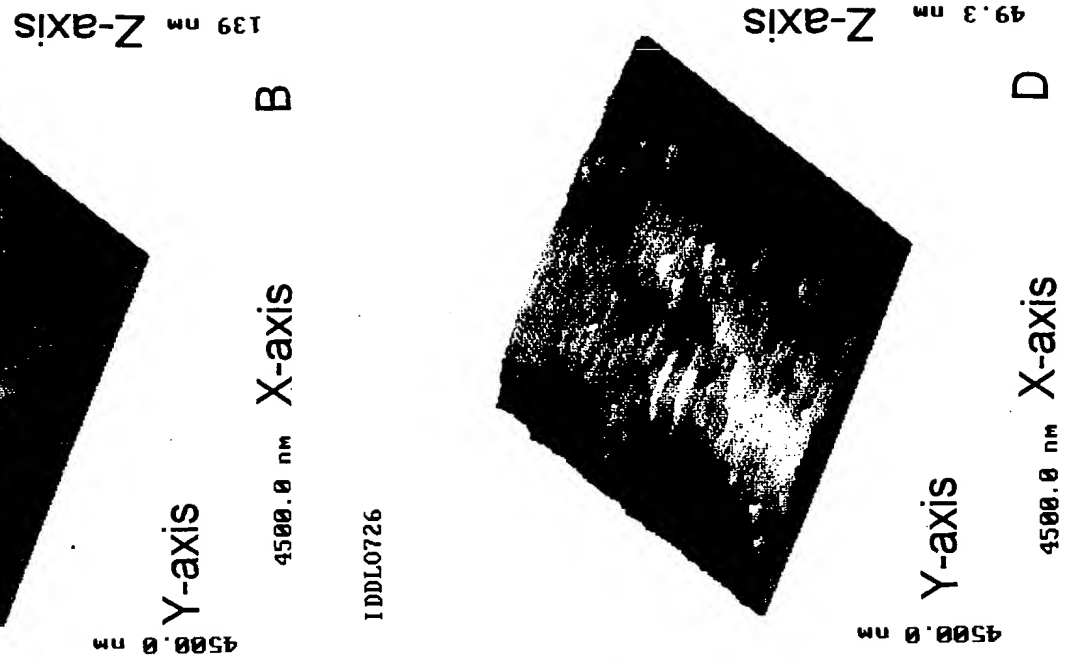
Fig. 6

**Fig. 7**

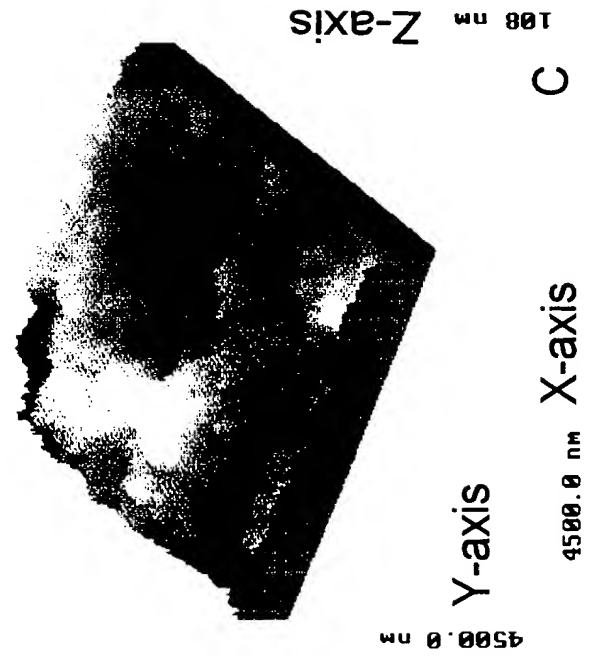
**DDI0721**



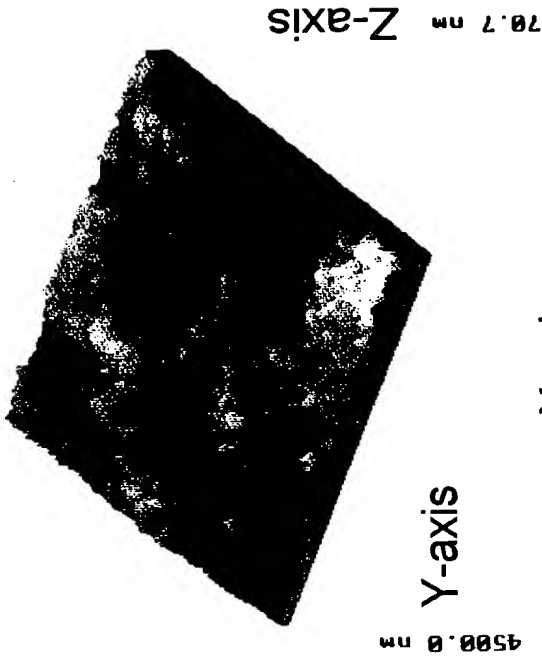
I DDL0726



**DDL0734**

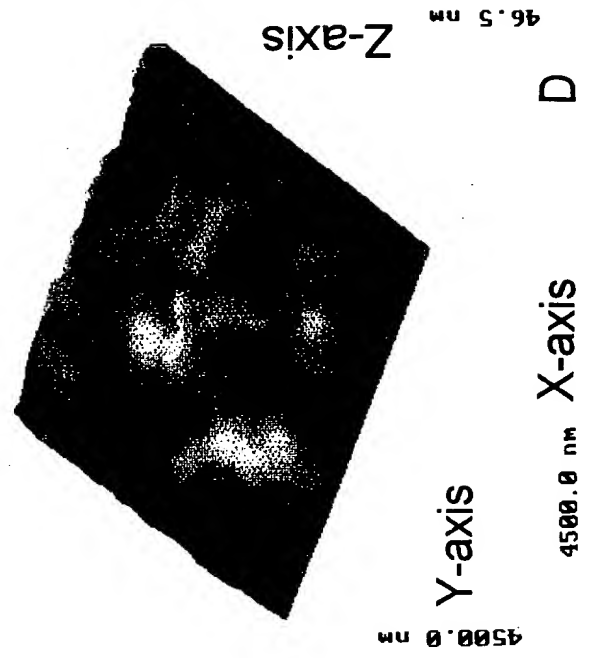


1DDL0359



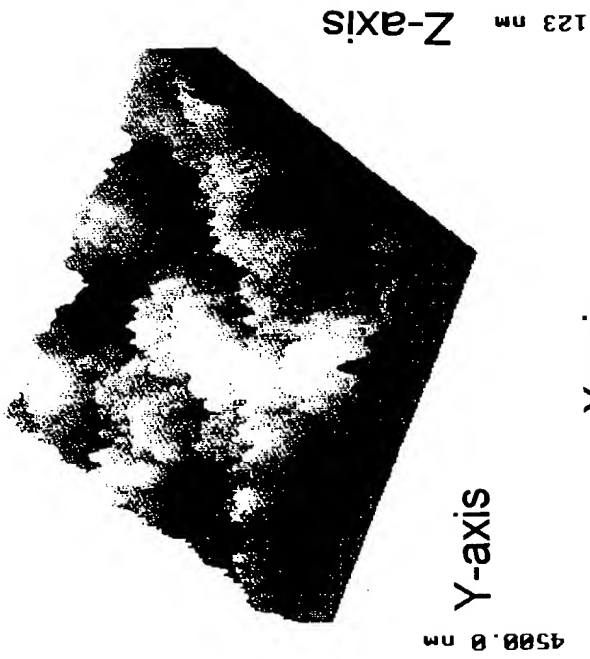
B

1DDL0689



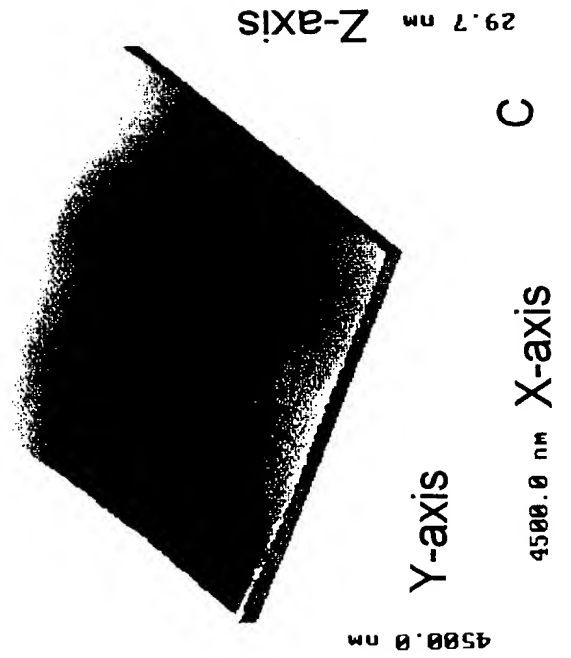
D

1DDL0340



A

1DDL0363



C

Fig. 8



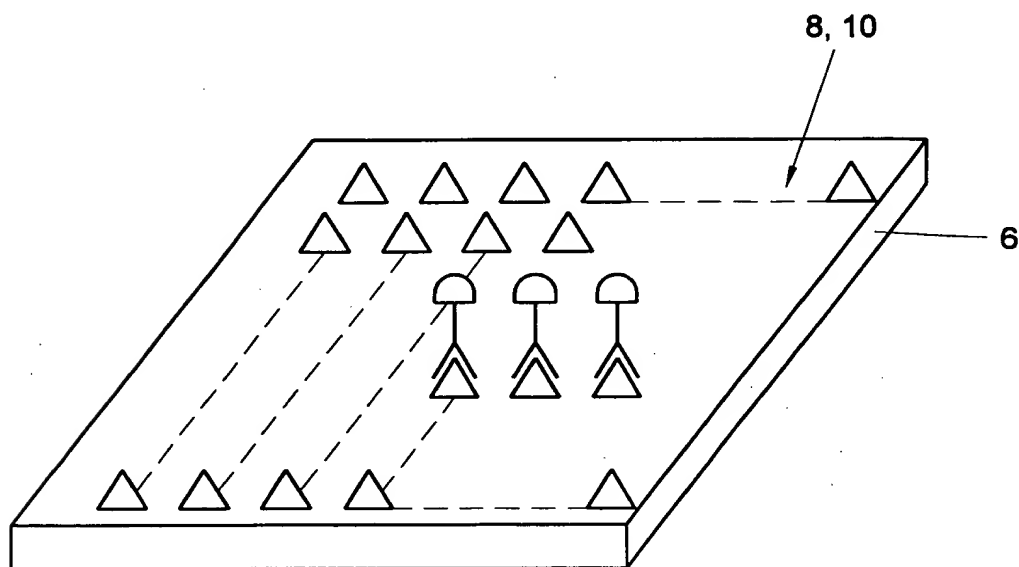
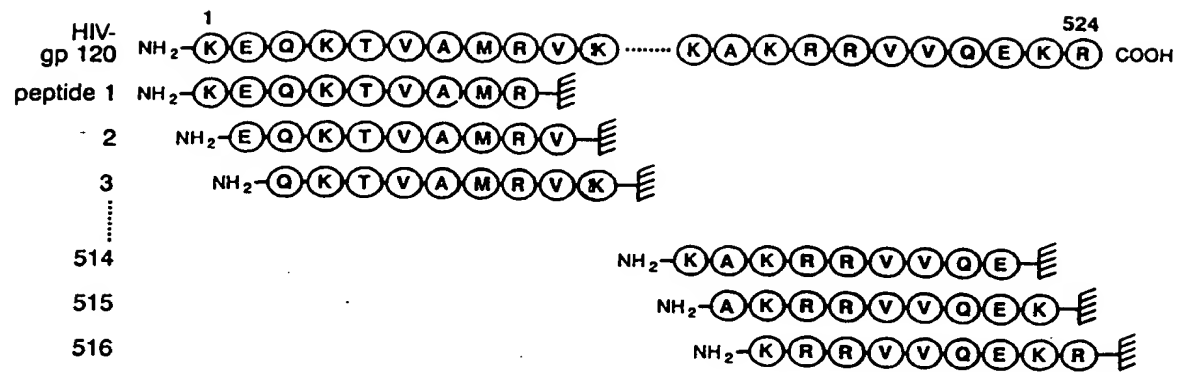


Fig. 9

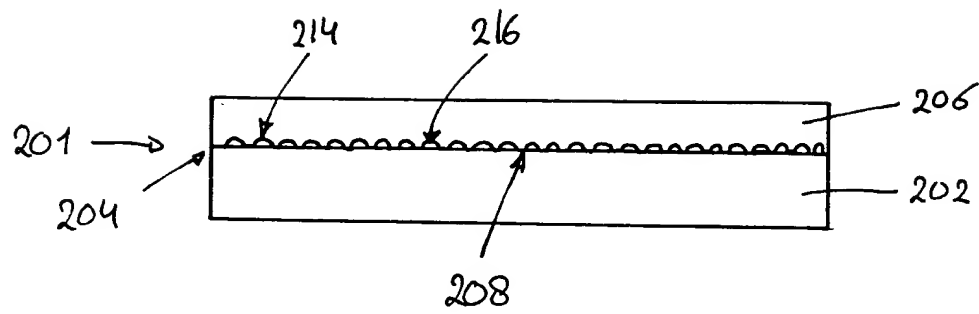


Fig 10

Titel: Werkwijze voor het vervaardigen van een  
preparaathouder voor chemische of biochemische  
tests.

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor  
het vervaardigen van een preparaatdrager, in het bijzonder  
geschikt voor gebruik bij chemisch en biochemisch  
onderzoek.

5 Bij biochemisch onderzoek wordt veelal gebruik  
gemaakt van zogenaamde miniwells in bijvoorbeeld microtiter  
platen, waarbij in elke miniwell een kleine hoeveelheid te  
onderzoeken preparaat wordt gebracht, wordt behandeld en  
wordt bekeken. Met behulp van markers kan daarbij worden  
10 vastgesteld of bepaalde bindingen in de betreffende  
miniwells hebben plaatsgevonden, waardoor de aard van het  
te onderzoeken preparaat kan worden bepaald.

Een dergelijke werkwijze heeft als voordeel dat een  
uniforme verdeling van het preparaat kan worden verkregen,  
15 waardoor verschillende tests tegelijkertijd op eenzelfde  
preparaat en/of dezelfde tests op verschillende preparaten  
kunnen worden uitgevoerd. Een dergelijke werkwijze heeft  
echter als nadeel dat het minimaal volume van een miniwell  
relatief groot is, bijvoorbeeld ongeveer 3 microliter,  
20 hetgeen betekent dat relatief veel preparaat nodig is voor  
het uitvoeren van de verschillende tests terwijl bovendien  
slechts een beperkt aantal microwells op een bepaald  
oppervlak kan worden aangebracht. Dit betekent dat een  
dergelijke werkwijze relatief veel ruimte op een  
25 preparaatdrager vergt.

Voorts is een werkwijze bekend waarbij gebruik wordt  
gemaakt van pinnen waarop een te onderzoeken preparaat  
wordt aangebracht, welke pinnen vervolgens in de holte van  
een microtiterplaat opgenomen vloeistoffen kunnen worden  
30 gedoopt, zodanig dat al dan niet bindingen tussen het te  
onderzoeken preparaat en de vloeistoffen in de  
verschillende holten plaatsvinden. Ook een dergelijke

werkwijze heeft als nadeel dat voor een relatief klein aantal te onderzoeken preparaatdelen een preparaatdrager met een relatief groot oppervlak nodig is.

De microtiterplaten en pinnen, toegepast bij  
 5 bovengenoemde werkwijze, kunnen zijn vervaardigd uit kunststof, bijvoorbeeld polyetheen, welke kunststof eventueel is voorzien van een reactieve stof, zodanig dat specifieke bindingen daaraan mogelijk zijn. De gebruikte kunststof heeft een relatief geringe vlakheid. De lokale  
 10 vlakheid is aanmerkelijk geringer dan de lokale vlakheid van bijvoorbeeld een glazen- of mica-oppervlak. Lokale vlakheid dient in deze begrepen te worden als vlakheid van een relatief klein oppervlak, bijvoorbeeld in de orde van vierkante micrometers. Dit betekent dat daaraan gebonden  
 15 elementen uit het preparaat, voorzien van een marker, relatief moeilijk waarneembaar zijn, met name doordat scherpstelling van een voor de analyse daarvan te gebruiken microscoop of fotografische inrichting daarop slecht mogelijk is. Immers, als gevolg van de relatief hoge  
 20 ruwheid van het oppervlak waarop de elementen zijn gebonden zullen deze in een richting haaks op het betreffende oppervlak gezien ten opzichte van elkaar zijn versprongen, zodat focuseren daarop wordt bemoeilijkt. Dit betekent dat het frontaal oppervlak van elke te analyseren holte of pin  
 25 relatief groot dient te zijn teneinde voldoende onderscheidend vermogen te hebben. Dit staat verdere schaalverkleining in de weg.

De uitvinding beoogt een werkwijze van de in de aanhef beschreven soort, waarbij de genoemde nadelen van de  
 30 bekende werkwijzen zijn vermeden, met behoud van de voordelen daarvan. Daartoe wordt een werkwijze volgens de uitvinding gekenmerkt door de maatregelen volgens conclusie 1.

Door te voorzien in een preparaatdrager met een  
 35 bijzonder vlak kunststof drageroppervlak, geschikt voor binding van de gewenste elementen in een preparaat wordt

het voordeel bereikt dat bijzonder dicht bij elkaar te detecteren elementen kunnen worden gebonden die toch van elkaar te onderscheiden zijn met bijvoorbeeld een microscoop of een CCD-camera of dergelijke inrichting.

5 Kunststof is daarbij in principe een gunstig materiaal voor het vervaardigen van preparaatdragers, doordat het relatief eenvoudig te bewerken is en relatief sterk is, terwijl een goede binding van verschillende preparaten, in het bijzonder biochemische preparaten zoals  
10 virussen, antigenen, peptiden en dergelijke daaraan kan worden verkregen.

Verrassenderwijs is thans gebleken dat met een werkwijze volgens de onderhavige uitvinding een zodanig glad kunststof oppervlak kan worden verkregen dat dit wèl,  
15 althans veel beter geschikt is als draagoppervlak voor preparaten bij dergelijk onderzoek. Door de kunststof laag, thermisch of chemisch behandeld, tegen een oppervlak van een dragerbasis met een geschikte oppervlakteruwheid te vormen blijkt namelijk dat daardoor de oppervlakteruwheid  
20 van het tegen de dragerbasis gelegen oppervlak aanmerkelijk kan worden verlaagd. Hiermee kan bijvoorbeeld een verlaging van de oppervlakteruwheid worden verkregen met een factor 5 tot 20 of meer. Dit betekent dat elementen van een preparaat die aan het drageroppervlak worden gebonden  
25 bijzonder kleine afmetingen kunnen hebben, terwijl daarmee toch op optimale wijze de aanwezigheid daarvan kan worden vastgesteld op basis van bijvoorbeeld daaraan gebonden markers. Op een klein drageroppervlak verkregen met een werkwijze volgens de uitvinding kunnen veel verschillende  
30 of gelijke elementen dicht bij elkaar te onderscheiden zijn. Dit kan bijvoorbeeld door druppels van 0,25 tot 0,5 nL op het oppervlak aan te brengen. In een voorkeursuitvoeringsvorm wordt dit aanbrengen uitgevoerd met een printer, in het bijzonder een printer van het  
35 inktjet- of bubblejet-type of dergelijke, bij voorkeur piezoelektrisch gestuurde printer. Dergelijke printers zijn

op zichzelf bekend. Toepassing daarvan voor het vervaardigen van (bio)chemische preparaten is bijzonder voordelig doordat een precieze plaatsing en dosering kan worden verkregen met hoge snelheid en reproduceerbaarheid.

5           Bovendien kunnen hiermee ook bijzonder kleine holten worden gevuld, bijvoorbeeld in de orde van grootte van 0-3  $\mu$ l, meer in het bijzonder tussen 0 en 0,1  $\mu$ l. Bij voorkeur hebben dergelijke holten bij een werkwijze volgens de uitvinding een genoemde, verlaagde oppervlakteruwheid, doch  
10 bij tests, waarbij gebruik wordt gemaakt van bijvoorbeeld fluorisatiemarkers of dergelijke, kan het binnenoppervlak van de holten ook ruwer zijn uitgevoerd, bijvoorbeeld normale ruwheid van PE.

          In een bijzonder voordelige uitvoeringsvorm wordt  
15 een werkwijze volgens de uitvinding gekenmerkt door de maatregelen volgens conclusie 2.

          Door althans gedeeltelijk smelten van de kunststof tegen een oppervlak van de dragerbasis kan op bijzonder eenvoudige wijze een optimale verdeling van de kunststof  
20 worden verkregen. Bovendien kan daarbij eenvoudig worden uitgegaan van bijvoorbeeld kunststoffolie of plaat. Het is evenwel ook mogelijk bijvoorbeeld polymerisatie van de kunststoflaag op het drageroppervlak te doen plaatsvinden of de kunststof zodanig chemisch te behandelen dat  
25 vervloeiing tegen het oppervlak van de dragerbasis optreedt.

          Zonder aan enige theorie te willen worden gebonden lijkt de bijzondere gladheid van het verkregen drager-oppervlak ten minste mede het gevolg te zijn van gebruik  
30 van een bijzonder gladde dragerbasis en de afwezigheid van hechting aan de dragerbasis. Een werkwijze volgens onderhavige uitvinding lijkt derhalve te kunnen worden geoptimaliseerd door gebruik van een dragerbasis met een optimale gladheid en afwezigheid van hechting tussen de  
35 kunststof en de dragerbasis. Echter, ook bij sub-optimale

omstandigheden kunnen reeds voldoende gladde drageroppervlakken worden verkregen.

In een eerste voorkeursuitvoeringsvorm wordt een werkwijze volgens de uitvinding voorts gekenmerkt door de  
5 maatregelen volgens conclusie 3.

Toepassing van een kunststof met ten minste één voor het betreffende preparaat actieve groep, biedt het voordeel dat direct de gewenste bindende groepen kunnen worden verkregen. Een groep geschikt voor vorming van amino-  
10 groepen gekoppeld aan het drageroppervlak biedt daarbij het voordeel dat een dergelijke preparaatdrager in het bijzonder geschikt is voor gebruik in de biotechnologie, meer in het bijzonder voor binding van aminozuren.

In een alternatieve uitvoeringsvorm wordt een  
15 werkwijze volgens de uitvinding gekenmerkt door de maatregelen volgens conclusie 4.

Wanneer de gebruikte kunststof niet direct, althans niet voldoende geschikt is voor binding van het betreffende preparaat, althans daartoe niet met linkers kunnen worden  
20 omgevormd, verdient het de voorkeur dat het drageroppervlak zodanig wordt behandeld dat op, althans in het drageroppervlak één of meer actieve groepen voor het betreffende preparaat worden aangebracht, wederom in het bijzonder groepen voor vorming van amino-groepen met behulp  
25 van linkers, zoals een -COOH of een -COO-methyl groep. Hiermee wordt het voordeel bereikt dat als kunststof voor het drageroppervlak een materiaal kan worden gebruikt met daarvoor bijzonder geschikte eigenschappen, zoals bijvoorbeeld polyetheen, terwijl de behandeling van het  
30 drageroppervlak er daarbij zorg voor draagt dat vorming van de amino-groepen toch bijzonder goed mogelijk wordt. Kunststof heeft daarbij het voordeel, boven bijvoorbeeld mica en glas, dat een dergelijke behandeling bijzonder eenvoudig en goed mogelijk is, waarbij steeds een geschikte  
35 behandeling kan worden gekozen, afhankelijk van het te binden preparaat. Met name -COOH groepen maken overigens

ook directe of indirecte binding van bijvoorbeeld virussen en dergelijke mogelijk, terwijl ook andere actieve groepen kunnen worden aangebracht, bijvoorbeeld  $-NH_2$  groepen.

In nadere uitwerking wordt een dergelijke werkwijze  
5 bij voorkeur gekenmerkt door de maatregelen volgens conclusie 5.

Door het drageroppervlak te enten met een kunststof kan een op zichzelf niet of onvoldoende bindend drager-  
oppervlak eenvoudig worden behandeld ten einde de gewenste  
10 activiteit te verkrijgen. Met name het gebruik van acrylic acid of methylacrylaat is daarvoor bijzonder geschikt.

In een verdere voordelige uitvoeringsvorm wordt een werkwijze volgens de uitvinding voorts gekenmerkt door de maatregelen volgens conclusie 6.

15 Verrassenderwijs is gebleken dat de oppervlakteruwheid van een drageroppervlak in voorkomende gevallen verder kan worden verlaagd door introductie van  $-NH_2$  groepen in, althans op het drageroppervlak. Zo kan bijvoorbeeld de oppervlakteruwheid van een met acrylic acid  
20 of methylacrylaat behandeld polyetheen daardoor zodanig worden verlaagd dat dit alsnog geschikt, althans beter geschikt kan worden gemaakt voor het gewenste gebruik.

In nadere uitwerking wordt een werkwijze volgens de uitvinding voorts gekenmerkt door de maatregelen volgens  
25 conclusie 7, bij voorkeur door de maatregelen volgens conclusie 7 en 8.

Door een oplossing van een geschikte monomeer met het drageroppervlak in contact te brengen en vervolgens de kunststof en oplossing te behandelen, zodanig dat poly-  
30 merisatie van althans een gedeelte van de monomeer optreedt, kan op bijzonder eenvoudige wijze een dunne zogenaamde hechtlaag, welke goed in staat is de gewenste verbindingen tot stand te brengen, op het drageroppervlak worden aangebracht. Door middel van geschikte bestraling  
35 kan deze polymerisatie bijzonder goed tot stand gebracht en gecontroleerd worden.



Als dragerbasis zijn bijzonder geschikt oppervlakken gevormd uit bijvoorbeeld mica of glas of materialen met vergelijkbare oppervlakteruwheid, hardheid en/of poreusiteit. Met name glas blijkt daarvoor bijzonder  
5 geschikt.

Tijdens gebruik van een preparaatdrager volgens onderhavige uitvinding wordt bij voorkeur in een aantal van elkaar gescheiden, spots te noemen vlekken een vloeistof op het oppervlak gebracht, waarbij elke spot een specifieke  
10 oppervlaktegrootte heeft. Op elke spot kunnen één of meer tests worden uitgevoerd. Door regulering van de dikte van de hechtlaag kan de grootte van elke spot worden bepaald. Verrassenderwijs is gebleken dat bij een relatief dunne hechtlaag met een bepaalde hoeveelheid vloeistof een  
15 kleinere spot wordt verkregen dan met eenzelfde hoeveelheid vloeistof bij een dikkere hechtlaag. Zonder aan enige theorie te willen worden gebonden lijkt dit het gevolg te zijn van de zuigende werking van de hechtlaag, althans van vervloeiing van de vloeistof die groter is bij een relatief  
20 dikke hechtlaag. Ter illustratie, met een hoeveelheid vloeistof per spotje van ongeveer 0,25 nL kan bij een hechtlaag met een dikte van 1 à enkele atomen een spot worden verkregen met een doorsnede van bijvoorbeeld 0,1 mm of kleiner, terwijl bij een hechtlaag met een aanmerkelijk  
25 grotere dikte spots kunnen worden verkregen met een doorsnede van bijvoorbeeld 5 mm of meer. Deze hoeveelheden en afmetingen dienen geenszins als beperkend te worden uitgelegd.

Met een werkwijze volgens de uitvinding kunnen ook  
30 holten in een oppervlak worden voorzien met de gewenste lage oppervlakteruwheid door gebruik van bijvoorbeeld glazen of micastaven met een sferisch einde dat in het oppervlak van het verhitte materiaal, zoals PE wordt gedrukt, bij voorkeur een matrix van dergelijke kogels,  
35 pennen of dergelijke. Daardoor wordt elke holte gevormd met een binnenoppervlak met genoemde plaatselijke lage ruwheid.

Met een dergelijke werkwijze kunnen bijvoorbeeld holten met een inhoud van minder dan 3  $\mu\text{L}$ , meer in het bijzonder minder dan 1  $\mu\text{L}$ , bijvoorbeeld 0,1  $\mu\text{L}$  of minder worden verkregen, waarin met behulp van jet-printertechniek of  
5 dergelijke druppels kunnen worden gedeponeerd met een bijzonder klein volume.

In een verdere nadere uitwerking wordt een werkwijze volgens de uitvinding voorts gekenmerkt door de maatregelen volgens conclusie 10.

10 Koppeling van informatiedragende polymeren aan het drageroppervlak biedt het voordeel dat eenvoudig nabehandeling van het oppervlak mogelijk is zonder dat de informatiedragende polymeren daarvan onbedoeld loskomen, zodat deze polymeren na genoemde behandeling eenvoudig  
15 kunnen worden onderzocht. Eventueel kunnen voor de koppeling van de polymeren linkers worden gebruikt, waardoor binding kan worden vereenvoudigd, terwijl de selectiviteit verder kan worden verhoogd, teneinde slechts de gewenste bindingen tot stand te laten komen, althans  
20 over te houden.

De uitvinding heeft voorts betrekking op een preparaatdrager, gekenmerkt door de maatregelen volgens conclusie 14.

Juist een preparaatdrager met een drageroppervlak  
25 dat uit kunststof is vervaardigd, met een oppervlakteruwheid die zodanig is dat markers van daaraan gehechte biochemische elementen daarop waarneembaar en localiseerbaar zijn, biedt het voordeel dat een dergelijke preparaatdrager bijzonder eenvoudig te vervaardigen en aan  
30 te passen is aan de te onderzoeken preparaten, terwijl een dergelijke preparaatdrager op bijzonder eenvoudige wijze kan worden gebruikt, met name ook omdat deze relatief sterk is. Doordat het drageroppervlak geschikt is voor specifieke binding van het preparaat wordt daarbij het voordeel  
35 bereikt dat tijdens gebruik niet gebonden elementen van het preparaat eenvoudig kunnen worden gewegwassen of anderszins

worden behandeld, zodat eenvoudig allerlei op zichzelf bekende tests op het preparaat kunnen worden uitgevoerd, zoals ELISA. Juist de specifieke binding van elementen uit het preparaat met specifieke actieve groepen van het drageroppervlak maakt deze tests mogelijk. De bijzondere vlakheid van het drageroppervlak biedt daarbij het voordeel dat een bijzonder hoge informatiedichtheid kan worden verkregen. De te onderzoeken elementen in het preparaat kunnen bijzonder dicht bij elkaar worden geplaatst zonder dat deze niet meer te onderscheiden zijn.

In nadere uitwerking wordt een preparaatdrager volgens de uitvinding voorts gekenmerkt door de maatregelen volgens conclusie 18.

-COOH groepen en -COO-methyl groepen in, althans op het oppervlak maken het op eenvoudige wijze mogelijk dat, met behulp van linkers amino-groepen aan het draagoppervlak worden gevormd, welke in het bijzonder geschikt zijn om aminozuren aan te koppelen. Dit biedt het voordeel dat op eenvoudige wijze al dan niet van te voren gesynthetiseerde, al dan niet complete peptiden, stukjes PNA, stukjes DNA, suikers, andere organische moleculen, eiwitten, virussen, bacteriën en cellen aan het oppervlak kunnen worden gekoppeld, aan de -COOH-groep, de -COO-methyl-groep of de gevormde amino-groep. Overigens kunnen ook andere actieve groepen worden toegepast. Zo kan bijvoorbeeld broomazijnzuur op het drageroppervlak worden gesynthetiseerd, waaraan vervolgens peptiden kunnen worden gekoppeld via een SH-groep van de betreffende peptiden.

Een preparaatdrager volgens onderhavige uitvinding biedt derhalve het voordeel dat een grote variëteit aan mogelijke chemische bindingen van elementen aan het draagoppervlak kan worden verkregen, waardoor de preparaatdrager nagenoeg universeel toepasbaar is.

De uitvinding heeft voorts betrekking op het gebruik van microscopie en/of fotografie voor biochemisch

onderzoek, gekenmerkt door de maatregelen volgens conclusie 20.

Juist gebruik van een preparaatdrager volgens onderhavige uitvinding in samenwerking met een microscoop of een foto-inrichting is voordelig daar de bijzondere vlakheid van het drageroppervlak van de preparaatdrager er voor zorgdraagt dat steeds goed kan worden scherp gesteld, zodat bijzonder kleine kleurvlakken of andersoortige markers op eenvoudige wijze detecteerbaar en van elkaar te onderscheiden zijn. Anders dan bij de bekende werkwijze kan derhalve op een relatief klein oppervlak een bijzonder groot aantal markers worden onderscheiden, bij voorkeur wordt daarbij een confocale microscoop scanner of dergelijke microscoop toegepast.

De uitvinding heeft verder betrekking op het gebruik van een printer voor het op een preparaatdrager volgens de uitvinding aanbrengen van te onderzoeken preparaat, gekenmerkt door de maatregelen volgens conclusie 21.

Printers, in het bijzonder een printer van het inktjet-type, bubblejet-type of vergelijkbare printers die werken met een "drop-on-demand" techniek zoals bijvoorbeeld een printer met een glazen capillair waaruit druppelsgewijs vloeistof wordt verspoten in zeer kleine "druppels" onder invloed van een vervorming van de wand met behulp van een piezoelëktisch element, bieden het voordeel dat hiermee relatief snel en met hoge nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid kleine tot bijzonder kleine hoeveelheden enigszins vloeibaar preparaat op een drageroppervlak kunnen worden gebracht, op bijzonder dicht bij elkaar gelegen onderscheiden posities. Eventueel kunnen daarmee ook conjugaten worden toegevoegd. Hierdoor kunnen op eenvoudige en snelle wijze preparaatdragers gereed worden gemaakt voor onderzoek, waarbij bijzonder veel informatie op relatief kleine preparaatdragers kan worden aangebracht. Dit maakt behandeling en analyse van de

informatie op de preparaatdragers bijzonder eenvoudig mogelijk.

De uitvinding heeft bovendien betrekking op een microtiterplaat of dergelijke preparaatdrager, voorzien van  
5 een matrix van opneemholten, gekenmerkt door de maatregelen van conclusie 22.

Een dergelijke preparaatdrager is in het bijzonder geschikt voor gebruik bij een printer als beschreven in conclusie 20. Daarbij wordt het voordeel bereikt dat de  
10 oppervlaktespanning van de in de holten te brengen vloeistof snel en eenduidig in de holten kan worden gebracht en het gevaar van luchtinsluiting wordt tegengegaan, bijvoorbeeld druppels van enkele tienden van  $\mu\text{L}$  of nL of minder kunnen daardoor worden gebruikt.  
15 Hierdoor is nog minder preparaat en minder oppervlak nodig. De holten hebben bij voorkeur doch niet noodzakelijkerwijs een binnenoppervlak met een relatief lage gladheid, verkregen met een werkwijze volgens één der conclusies 1-13.

20 Een dergelijke preparaatdrager heeft bij voorkeur buitenafmetingen van ongeveer 2,5 bij 7,5 cm, zodat deze in een standaard detectieinrichting, geschikt voor microscoop-glaasjes plaatsbaar is.

Verdere nadere uitvoeringsvoorbeelden van werkwijzen  
25 en preparaatdragers volgens de uitvinding zijn gegeven in de verdere volgconclusies.

Ter verduidelijking zullen uitvoeringsvoorbeelden van een werkwijze en een preparaatdrager hieronder nader worden toegelicht aan de hand van de tekening. Daarin  
30 toont:

- fig. 1 een dragerbasis;
- fig. 2 een dragerbasis met een daarop aangebrachte kunststoflaag;
- fig. 3 de kunststoflaag, losgenomen van de  
35 dragerbasis;

fig. 3a een kunststoflaag volgens fig. 3, in een alternatieve kunststof.

fig. 4 de kunststoflaag met op het drageroppervlak geënte hechtlaag;

5 fig. 5 schematisch een weergave van een preparaatdrager met aan het drageroppervlak gehechte peptiden;

fig. 6 in sterke uitvergroting het oppervlak van respectievelijk het oppervlak van een gebruikelijk  
10 toegepaste pen, het oppervlak van mica, het oppervlak van een drageroppervlak volgens onderhavige uitvinding, vervaardigd uit polyetheen en het oppervlak van glas;

fig. 7 een viertal oppervlakken volgens onderhavige uitvinding, waarbij het drageroppervlak is geënt met een  
15 laag methylacrylaat;

fig. 8 een viertal oppervlakken van een drageroppervlak volgens onderhavige uitvinding, geënt met polyacrylaat;

fig. 9 schematische weergave van een pepscan op een  
20 drageroppervlak; en

fig. 10 een dragerbasis met een daarop aangebrachte kunststoflaag, vergelijkbaar met fig. 2, voor de vorming van een microtiterplaat met een matrix van opneemholten.

In deze beschrijving hebben gelijke of  
25 corresponderende delen gelijke of corresponderende verwijzingscijfers. Voorts wordt als voorbeeld in deze beschrijving, mits niet anders aangegeven, uitgegaan van een preparaatdrager geschikt voor het op een drageroppervlak daarvan vormen van amino-groepen,  
30 vervaardigd uit behandeld, tegen glas gesmolten polyetheen of polypropreen. Het zal evenwel duidelijk zijn dat ook andere kunststoffen en een andere dragerbasis kunnen worden toegepast, bijvoorbeeld een dragerbasis van mica en een polycarbonaat, acrylic acid of methylacrylaat als kunststof  
35 voor de eigenlijke preparaatdrager. Met name de laatstgenoemde kunststoffen kunnen daarbij het voordeel bieden

dat daarop direct -COOH- of -COO-methyl groepen beschikbaar zijn. Polyetheen en polypropyleen zijn relatief inert. Zij bieden daarbij echter het voordeel dat zij relatief hard en sterk zijn, zonder dat zij bros zijn. Bovendien kunnen  
 5 hierop eenvoudig andere kunststoffen worden geënt.

In deze beschrijving zal steeds een relatieve vlakheidsmaat worden aangehouden, waarbij de maximale hoogte (Z-as) van uitsteeksels boven een nominaal referentievlak wordt gegeven als percentage van één der  
 10 horizontale maten (X-as) van het gescande oppervlak. Deze horizontale maat is in deze beschrijving in de orde van grootte van 2000-4500 nanometer. De maat voor vlakheid V wordt derhalve uitgedrukt in de volgende formule:

$$15 \quad \frac{Z-as}{X-as} \times 100\%$$

Voorbeelden van de vlakheid V van materialen:

- mica: V = 0,1% (fig. 6b);
- glas: V = 0,3% (fig. 6d);
- 20 - hoog moleculair polyetheen: V = 10% (fig. 6a);
- polyetheenfolie; V = 3% (fig. 6b); en
- een polyetheenvlak gevormd volgens de uitvinding, V = 0.6% (fig. 6c);
- polyetheen pin oppervlak: V ≈ 28%.

25

Deze afmetingen en waarden zijn slechts gegeven als voorbeeld en dienen geenszins als beperkend te worden uitgelegd.

Legenda: In de tekening geldt:

- 30
- = -COOH of -COO-methyl
  - = -NH<sub>2</sub>
  - ∧ = antilichaam
  - ⚡ = peptide
  - = marker

35

Fig. 1 toont in doorgesneden zijaanzicht een dragerbasis 2, gevormd uit mica, met een bovenoppervlak 4 met een vlakheid V van ongeveer 0,1%. Dit betekent derhalve dat zich op het vlak 4 oneffenheden bevinden met een

5 maximale hoogte in de Z-richting gemeten boven het nominale vlak N van ten hoogste enkele nanometers, bijvoorbeeld 4 à 5 nanometer. Het oppervlak 4 van mica is derhalve bijzonder vlak. Het oppervlak 4 is bijvoorbeeld rechthoekig met buitenafmetingen van 25 x 25 millimeter. De basisdrager

10 2 heeft een dikte van bijvoorbeeld 0,5 millimeter.

In de in fig. 2 getoonde toestand is op het gladde bovenoppervlak 4 van de basisdrager 2 een kunststoflaag 6 aangebracht. In de getoonde uitvoeringsvorm is dit een polyetheenfolie met een eigen vlakheid van ongeveer 3%. De

15 folielaag heeft een dikte van bijvoorbeeld 0,035 millimeter.

De folielaag 6 en/of de basisdrager 2 worden zodanig verwarmd dat ten minste de naar het oppervlak 4 gekeerde zijde van de kunststoflaag 6 smelt en op het oppervlak 4

20 vervloeit, waarna het geheel wordt afgekoeld. Tussen de glas-basisdrager en de kunststoflaag 6 zal geen hechting van enige betekenis optreden, waardoor de kunststoflaag 6 eenvoudig weer van de basisdrager 2 kan worden afgenomen. Verrassenderwijs is gebleken dat het oppervlak 8 van de

25 kunststoflaag 6 dat naar de basisdrager 2 gekeerd was een vlakheid V heeft gekregen die aanmerkelijk beter is dan de vlakheid V van de gebruikte polyetheenfolie. De vlakheid van het drageroppervlak 8 is bijvoorbeeld ongeveer 0,6% wanneer geen verder speciale maatregelen zijn genomen.

30 Overigens wordt opgemerkt dat vervloeiing van ten minste het naar de basisdrager 2 gekeerde deel van de kunststoflaag 6 in voorkomende gevallen ook, althans mede kan worden verkregen door bijvoorbeeld een chemische reactie.

35 Fig. 3 toont een preparaatdrager 1 gevormd volgens onderhavige uitvinding, waarbij het drageroppervlak 8 naar



boven is gekeerd. In deze getoonde uitvoeringsvorm is als kunststof bijvoorbeeld polyetheen of polypropreen gebruikt, dat relatief inert is. Binding hieraan van biochemische elementen is daardoor feitelijk niet mogelijk. In fig. 3A is een alternatieve uitvoeringsvorm getoond, waarbij als kunststoflaag 106 een kunststof is toegepast met daarin actieve groepen 112, symbolisch weergegeven door op stokjes geplaatste bolletjes. Een dergelijke kunststof kan bijvoorbeeld een polycarbonaat, een acrylic acid of methyl acrylaat zijn, waarin bijvoorbeeld als actieve groepen 112 -COOH of -COO-methyl groepen aanwezig zijn, in de tekening symbolisch weergegeven met respectievelijk een vierkantje en een bolletje op een stokje.

In fig. 4 is een preparaatdrager 1 getoond met daarop geënt een kunststoflaag 10, bijvoorbeeld een gepolymeriseerde laag acrylic acid of methylacrylaat. Een dergelijke laag 10 kan als volgt op de kunststofdragerlaag 6 van polyetheen of andere kunststof worden aangebracht.

Het kunststofdeel 6 met het gladde drageroppervlak 8 wordt ondergedompeld in een oplossing van een monomeer met een specifieke concentratie, waarna de oplossing met de daarin opgenomen kunststof wordt bestraald met radioactieve straling van een specifieke intensiteit, zodanig dat ten minste op het drageroppervlak 8 polymerisatie van de betreffende monomeer optreedt.

Geschikte monomeeroplossingen zijn bijvoorbeeld een 0,6% of 6% acrylic acid (AC) monomeeroplossing of een 0,6% of 6% methylacrylaat (MA) monomeeroplossing. Deze kunnen bijvoorbeeld bestraald worden met  $\gamma$ -straling van bijvoorbeeld 2 of 12 kilo Gray (kGy). Door een geschikte keuze van de bestralingsduur wordt daarmee een gewenste dikte van de betreffende gepolymeriseerde laag op en gedeeltelijk in het drageroppervlak 8 verkregen. Een dergelijke hechtlaag is bijvoorbeeld enkele moleculen of ketens dik, zodat de vlakheid van het drageroppervlak 8 zoveel mogelijk wordt behouden of zelfs nog wordt vergroot.

In fig. 7 en 8 is een achttal preparaatdragers volgens figuur 4 weergegeven, geënt in oplossingen respectievelijk van monomeren methylacrylaat (fig. 7) of acrylic acid (fig. 8) met verschillende concentraties en  
5 verschillende bestralingshoeveelheden. Zoals blijkt uit fig. 7 zijn met name de in de figuren 7c, 7d en 7h weergegeven oppervlakken bijzonder vlak en derhalve uitermate geschikt voor preparaatonderzoek. De codering geeft achtereenvolgens de dragerkunststof (PE), de  
10 concentratie van de oplossing (in %), de hoeveelheid bestraling (in kilo Gray) en de gebruikte ent-kunststof (AC of MA). Uiteraard zijn ook andere combinaties mogelijk, bijvoorbeeld meer of minder of andere monomeren, andere belichtingshoeveelheden, andere polymerisatiemethoden en  
15 andere dragerkunststoffen. Geschikte keuzen daaruit zijn voor de vakman direct duidelijk en zonder verdere uitvinding te bepalen.

Een volgens de uitvinding vervaardigde preparaatdrager kan als volgt worden toegepast.

20 Met behulp van EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide) wordt het peptide AC-SDSSFFSYGEIPFGK op het drageroppervlak aangebracht, gekoppeld met een actieve groep 12. Vervolgens wordt hierop een ELISA uitgevoerd met een monoklonaal antibody (mAb) 59.7  
25 (1/10.000) voor en na onderbreking in een onderbrekingsbuffer. Hiertoe wordt het draagoppervlak ultrasoon schoongemaakt bij 70° in aanwezigheid van sodiumdedocylsulfaat (SDS) en beta-mercaptoethanol (BME). De resultaten van deze ELISA zijn gegeven in tabel 1.  
30 Duidelijk blijkt dat op de met kunststof (acrylic acid) geënte drageroppervlak het peptide is gekoppeld, aangezien na onderbreken nog steeds binding van het monoklonaal antibody mogelijk is, terwijl dit na onderbreken bij het kale drageroppervlak 8 niet meer mogelijk is. Gebleken is  
35 dat speciaal de geënte kunststoffen (0,6/12Ac) en (0,6/2Ac) bijzonder goede resultaten geven.

Van te voren gesynthetiseerde complete peptiden, zowel als stukjes PNA, stukjes DNA, suikers of volledige gecompliceerde organische moleculen, eiwitten, virussen, bacteriën en cellen kunnen aan een drageroppervlak van een  
5 preparaatdrager volgens onderhavige uitvinding worden gekoppeld. Deze kunnen in principe zowel aan de op het drageroppervlak door linkers met de -COOH- of -COO-methyl groepen gevormde amino groepen worden gekoppeld. Ook kan bijvoorbeeld broomazijnzuur aan een NH<sub>2</sub> groep worden  
10 gekoppeld voor verkrijging van een broom-groep. Aan deze broom-groep kan een peptide via een SH-groep daar van worden gekoppeld. Dit kan prijstechnisch voordelig zijn. Een aldus gevormde en behandelde preparaatdrager kan worden bekeken met bijvoorbeeld een confocale microscoop scanner.  
15 Hiermee kan een goed beeld worden verkregen van een relatief groot oppervlak vergeleken met bijvoorbeeld digitaal opgeslagen vergelijkingsmateriaal.

Bij een andere toepassing van een preparaatdrager volgens onderhavige uitvinding worden virussen of  
20 antilichamen direct of via linkers met actieve groepen 12 op, althans in het drageroppervlak 8 gebonden.

De te binden virussen of antilichamen hebben of worden voorzien van actieve groepen, bijvoorbeeld -COOH groepen en/of -NH<sub>2</sub> groepen, welke direct of via linkers  
25 kunnen worden gekoppeld aan de actieve groepen 12 op, althans in het drageroppervlak 8, 10. Zo kunnen bijvoorbeeld -NH<sub>2</sub> groepen van een virus worden gekoppeld aan een -COOH groep of een -NH<sub>2</sub> groep van het drageroppervlak 8, 10, terwijl -COOH groepen van een virus  
30 bijvoorbeeld kunnen worden gekoppeld aan -NH<sub>2</sub> groepen van het drageroppervlak 8, 10. Als linkers kunnen verschillende chemicaliën worden toegepast, bijvoorbeeld HMDA (Hexamethyleendiamine) of EDA (Ethyleendiamine). Daarmee kunnen bijvoorbeeld -NH<sub>2</sub> groepen als actieve groepen worden  
35 geïntroduceerd in of op een drageroppervlak 8, 10 dat slechts of in hoofdzaak bijvoorbeeld -COOH groepen als

actieve groepen 12 omvat. HMDA kan worden gebruikt door koppeling van Boc HMDA (Butyloxycarbonylhexamethyleen-diamine) via DCC (Dicyclohexylcarbodiimine) aan de -COOH groepen, waardoor na Boc-deprotectie -NH<sub>2</sub> groepen

5 beschikbaar komen voor koppeling van antigen. Bij gebruik van EDA kan aan met methylacrylaat behandeld oppervlak 8, 10 een behandeling volgen van bijvoorbeeld 72 uur bij 40°C met genoemd EDA, waarbij actieve -NH<sub>2</sub> groepen beschikbaar komen. De eerste drageroppervlakken zijn bijvoorbeeld

10 PE (0,6/2 Ac) Hmda en PE(0,6/12Ac)-Hmda, terwijl het tweede type oppervlak bijvoorbeeld voldoet aan PE(0,6/2 MA)-EDA.

De overige in fig. 7 en 8 getoonde oppervlakken zijn minder vlak. Introductie van -NH<sub>2</sub> groepen in deze oppervlakken, bijvoorbeeld op de hiervoor beschreven wijze,

15 leidt verrassenderwijze tot een verbetering van de vlakheid V van deze oppervlakken. Dit betekent dat deze oppervlakken door introductie van genoemde -NH<sub>2</sub> groepen daarin ook, althans nog beter geschikt worden voor gebruik als

preparaatdrager voor ten minste vormgericht onderzoek.

20 Een verder onderzoek met een preparaatdrager wordt hieronder globaal beschreven, als voorbeeld en dient geenszins als beperkend te worden opgevat.

Fig. 9 toont schematisch een weergave van een pepscan-onderzoek, omvattende de primaire aminozuur

25 sequentie van GP120 van HIV1, het hoofdglycoproteïne van HIV-1. Elke cirkel verbeeldt een aminozuur. Voor de aminozuren is de 1-lettercode gebruikt (A=alanine, C=cysteine, D=aspartic acid, E=glutamic acid, F=phenylalanine, G=glycine, H=histidine, I=isoleucinem,

30 K=lysine, L=leucine, M=methionine, N=asparagine, P=proline, Q=glutamine, R=arginine, S-Serine, T=trreonine, V=valine, W=tryptophan, y=tyrosine).

De aminozuursequentie van GP120 van HIV-1 wordt verdeeld in overlappende peptiden als aangegeven. Peptide

35 nummer 1 is de peptide die start met aminozuur nummer 1 en eindigt met aminozuur nummer 9, peptide nummer 2 is de

peptide die start aminozuur nummer 2 en loopt tot aminozuur nummer 10, enz. De peptiden worden gesynthetiseerd op het drageroppervlak, zoals getoond onder in fig. 9. De peptiden zijn aangegeven met individuele driehoekjes. Vervolgens

5 wordt het volledige drageroppervlak in contact gebracht met hetzelfde antilichaam, weergegeven door  $\Lambda$ . Sommige peptiden zullen binden aan dit antilichaam. Nadat de oplossing van antilichaam van het drageroppervlak is gespoeld kan de nog op het drageroppervlak aanwezige antilichaam, dat is

10 gebonden door de peptiden, worden aangetoond met behulp van anti-antilichaamconjugaat. Hierdoor wordt direct de sequentie van de peptide die heeft gebonden aan het antilichaam bepaald. Markers kunnen zijn aangebracht, bij voorkeur fluorescentiemarkers doch ook andere markers

15 kunnen worden toegepast, bijvoorbeeld radioactieve markers, edelmetaal zoals goud, kleurmarkers en dergelijke. Zoals blijkt uit fig. 9 zijn de individuele peptiden bijzonder dicht bij elkaar geplaatst. Doordat het drageroppervlak bijzonder vlak is kunnen deze, althans de daaraan gehechte

20 markers toch individueel worden waargenomen met een confocale microscoop scanner. Dit betekent bovendien dat slechts bijzonder weinig van de verschillende bij de test benodigde elementen noodzakelijk is, zoals de te onderscheiden peptiden, conjugaat, antilichaam, anti-

25 antilichaamconjugaat en dergelijke.

Nadat de gewenste sequentie van de of elke betreffende peptide is vastgesteld kan het antilichaam worden verwijderd van de peptiden en kunnen de peptiden worden hergebruikt. Door gebruik te maken van een

30 preparaatdrager volgens onderhavige uitvinding kunnen bijzonder veel verschillende peptide worden gesynthetiseerd in relatief korte tijd.

Het verdient de voorkeur dat de peptiden met behulp van een inktjetprinter of een bubblejetprinter of

35 dergelijke op "drop-on-demand" techniek gebaseerde printers op het drageroppervlak worden aangebracht, doordat hierdoor

eenvoudig, snel en met grote nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid een bijzonder dichte pakking van de betreffende peptiden op het drageroppervlak kan worden  
aangebracht. Bijvoorbeeld kunnen 'druppels' van 0,25 tot  
5 0,5 nanoliter met 1 tot 2 kilohertz worden verspoten. De dragerkunststof heeft daarbij het voordeel dat dit goed bestand is tegen de peptide-chemie, welke te agressief lijkt wanneer glas als drager zou worden gebruikt. Met een werkwijze volgens onderhavige uitvinding kan een zeer  
10 vergaande microturisatie van de pepsan worden verkregen. Voor het scannen van het oppervlak met daaraan gebonden peptiden en dergelijke wordt bij voorkeur een confocale microscoop toegepast. Juist bij een dergelijke microscoop heeft de bijzondere gladheid van het oppervlak grote  
15 voordelen.

In tabel 2 is voor de acht in fig. 7 en 8 getoonde oppervlakken weergegeven ELISA-waarden van monoklonale antilodies en hun bijbehorende peptiden, gesynthetiseerd op de betreffende drageroppervlakken. Hieruit blijkt dat  
20 synthesisering op alle gebruikte geënte oppervlakken mogelijk is, ongeacht de dikte daarvan. Zo kunnen peptiden, DNA, PNA en dergelijke informatiedragende polymeren daarop worden gesynthetiseerd.

Een preparaatdrager volgens de onderhavige  
25 uitvinding biedt als belangrijk voordeel ten opzichte van de stand van de techniek dat op bijzonder eenvoudige wijze verschillende soorten actieve groepen aan, althans in het drageroppervlak kunnen worden aangebracht, zoals de genoemde -COOH groepen en -NH<sub>2</sub> groepen. Al naar gelang de  
30 gewenste toepassing en de gewenste bindingen kan het drageroppervlak, indien nodig, op geschikte wijze worden behandeld. Bovendien kunnen de actieve groepen bijzonder dicht op elkaar worden aangebracht, zodat een hoge dichtheid van de te detecteren elementen uit het preparaat  
35 kan worden verkregen, bijvoorbeeld 999 peptiden per cm<sup>2</sup>. Daardoor kan het oplossend vermogen van de gebruikte

detectietechniek aanmerkelijk worden vergroot, althans op meer optimale wijze benut.

De vlakheid van het drageroppervlak 8 kan eventueel nog verder worden vergroot door gebruik te maken van  
5 daartoe geëigende technieken, bijvoorbeeld vacuümtechnieken bij het op de dragerbasis 2 plaatsen en smelten, althans doen vervloeien van de kunststoflaag 6. Hierdoor wordt verhinderd dat gasinsluitels tot oneffenheden kunnen leiden.

10 Fig. 10 toont in doorgesneden zijaanzicht een dragerbasis 202, voorzien van een bovenoppervlak 204, waarop uitstulpingen 214 zijn aangebracht, welke in hoofdzaak sferisch zijn, bijvoorbeeld halve bollen. De  
15 bolle zijde daarvan is van de dragerbasis 202 afgekeerd. Een kunststof laag 206 is over de basisdrager 202 en de uitstulpingen 214 aangebracht, bijvoorbeeld als beschreven aan de hand van de figuren 1 en 2. Hierdoor worden in de kunststoflaag 206 holten 216 verkregen met een  
20 binnenoppervlak dat overeenkomt met de buitenvorm van de uitstulpingen 214 en met een daarmee vergelijkbare oppervlakteruwheid. De uitstulpingen 214 kunnen bijvoorbeeld worden gevormd door glazen of micadelen, zoals kogels die voor ongeveer de helft in de basisdrager 202 zijn gedrukt. Ook kunnen deze daarmee integraal zijn  
25 gevormd. Daarmee worden holten 216 verkregen met een binnenoppervlak met bijzonder lage oppervlakteruwheid, bijvoorbeeld in de orde van grootte als beschreven aan de hand van de figuren 1-9. De holten zijn bij voorkeur in een N x M matrix opgesteld, vergelijkbaar met bekende  
30 microtiterplaten.

De holten 216 kunnen een inhoud hebben die correspondeert met die van de holten van bekende microtiterplaten, dat wil zeggen in de orde van grootte van  
bijvoorbeeld ongeveer 3  $\mu$ L. Het is evenwel ook mogelijk  
35 deze aanmerkelijk kleiner uit te voeren, bijvoorbeeld met een zodanige diameter dat holten 216 worden verkregen met

een inhoud van aanmerkelijk minder dan 3  $\mu\text{L}$ , bijvoorbeeld minder dan 1  $\mu\text{L}$  of zelfs minder dan 0,1  $\mu\text{L}$ . Deze holten worden bij voorkeur, doch niet noodzakelijkerwijs gevormd met uitstulpingen 214 met een bijzonder glad

5 buitenoppervlak. Een drager 206 met dergelijke bijzonder kleine opneemholten 216 biedt het voordeel dat bijzonder weinig preparaat noodzakelijk is en bijzonder veel opneemholten 216 op een relatief klein oppervlak kunnen worden voorzien. Een dergelijke preparaatdrager 201 is in

10 het bijzonder geschikt voor gebruik met een printer van het "drop-on-demand"-type, zoals een inktjet- of bubblejetprinter of dergelijke. Hierdoor kunnen bijzonder kleine volumina in de opneemholte 216 worden gebracht, zonder dat daarbij lucht in de holte wordt ingesloten,

15 terwijl de oppervlaktetension van de in te brengen preparaatvloeistof relatief eenvoudig kan worden overwonnen.

In een alternatieve, niet getoonde uitvoeringsvorm worden in plaats van de uitstulpingen pennen toegepast met

20 een met de uitstulpingen 214 overeenkomend einde, welke pennen relatief ten opzichte van de kunststoflaag 206 worden bewogen voor vorming van de gewenste holten 216. Ook op deze wijze kunnen regelmatige of andere patronen van holten 216 worden verkregen met de gewenste inhoud. Holten

25 216 met genoemde relatief kleine inhoud (minder dan 3  $\mu\text{L}$ , in het bijzonder minder dan 1 en bij voorkeur minder dan 0,1  $\mu\text{L}$ ) zijn in het bijzonder geschikt voor analyse van daarin opgenomen preparaten, met behulp van bijvoorbeeld luminescentie, fluorescentie of vergelijkbare markers welke

30 kunnen worden waargenomen zonder gebruik te maken van HFM-microscopie.

De uitvinding is geenszins beperkt tot de in de tekening en de beschrijving getoonde uitvoeringsvoorbeelden. Vele variaties daarop zijn binnen

35 het door de bijgevoegde conclusies geschetste raam van de uitvinding mogelijk.



Zo kunnen andere kunststoffen worden toegepast voor vorming van het drageroppervlak en/of voor het enten daarop van de laag 10. Geschikte kunststoffen kunnen bijvoorbeeld worden gekozen op basis van de gewenste actieve groepen, de  
5 gewenste hardheid of flexibiliteit, de gewenste combinatie van dragerkunststof en ent-kunststof, eventuele bestandheid tegen bijvoorbeeld chemicaliën, bestraling, belichting en dergelijke. Dergelijke keuzen zullen voor de vakman binnen het raam van de uitvinding direct duidelijk zijn.

10 Voorts kunnen preparaatdragers volgens onderhavige uitvinding ook voor andere onderzoeken worden toegepast, bijvoorbeeld waarbij gebruik wordt gemaakt van markers voor het vaststellen van de aanwezigheid van bepaalde elementen, bijvoorbeeld fluorescerende, kleurende of stralende  
15 markers. In de getoonde uitvoeringsvoorbeelden is de kunststoflaag steeds op de basisdrager aangebracht, doch het is uiteraard ook mogelijk een kunststoflaag te bewerken met een voldoende glad oppervlak van een basisdrager die tegen of langs het oppervlak van de kunststoflaag wordt  
20 bewogen, bijvoorbeeld een basisdrager van mica of glas. Het is eveneens mogelijk polymerisatie van een kunststof te doen plaatsvinden op een basisdrager met de gewenste gladheid of op andere wijze vorming van kunststof daarop met geschikte eigenschappen te verkrijgen. De drager kan  
25 daarbij bijvoorbeeld een gedeelte van een mal zijn. Uiteraard kunnen allerlei verschillende preparaten op een preparaatdrager volgens onderhavige uitvinding worden gebonden. De beschreven virussen dienen slechts als voorbeeld.

30 Deze en vele vergelijkbare variaties worden geacht binnen het door de conclusies geschetste raam van de uitvinding te vallen.

## CONCLUSIES

1. Werkwijze voor het vervaardigen van een preparaat-drager, in het bijzonder geschikt voor gebruik bij chemisch en biochemisch onderzoek, waarbij:
  - op ten minste één oppervlak van een dragerbasis een  
5 laag kunststof wordt aangebracht,
  - waarbij de kunststoflaag thermisch en/of chemisch wordt behandeld, zodanig dat de oppervlakteruwheid van de naar de dragerbasis gekeerde zijde van de kunststof wordt verlaagd, terwijl deze niet aan de dragerbasis hecht,
  - 10 - waarna de kunststof van de dragerbasis wordt afgenomen, waarbij het vrijkomende, relatief gladde oppervlak van de kunststof een drageroppervlak vormt.
2. Werkwijze volgens conclusie 1, waarbij het kunststof door althans gedeeltelijk smelten over het ten minste ene  
15 betreffende vlak van de dragerbasis wordt aangebracht.
3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, waarbij als kunststof een mono- of polymeer wordt toegepast met ten minste één voor het betreffende preparaat actieve groep, in het bijzonder een groep die kan worden gebruikt voor de  
20 vorming van een amino-groep zoals een -COOH of een -COO-methyl groep.
4. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, waarbij het drageroppervlak wordt behandeld, zodanig dat het drageroppervlak van ten minste één voor het betreffende preparaat  
25 actieve groep omvat, in het bijzonder een groep die kan worden gebruikt voor de vorming van een amino-groep zoals een -COOH of een -COOH methyl groep.
5. Werkwijze volgens conclusie 4, waarbij het drageroppervlak wordt geënt met een kunststof, in het  
30 bijzonder met behulp van een mono- of polymeer, bij voorkeur acrylic acid of methyl acrylaat.
6. Werkwijze volgens één der conclusies 4 of 5, waarbij door introductie van -NH<sub>2</sub> groepen in, althans op het

drageroppervlak de oppervlakteruwheid daarvan wordt verlaagd.

7.       Werkwijze volgens één der conclusies 4 - 6, waarbij ten minste de kunststoflaag op ten minste het  
5 drageroppervlak in contact wordt gebracht met een oplossing van een monomeer, waarna de kunststof en de oplossing zodanig worden behandeld dat polymerisatie van althans een gedeelte van de monomeer optreedt op het drageroppervlak, waartoe bij voorkeur de kunststof tezamen met de oplossing  
10 wordt blootgesteld aan straling.
8.       Werkwijze volgens conclusie 7, waarbij het drageroppervlak wordt voorzien van een gepolymeriseerde hechtlaag met een relatief geringe dikte, bij voorkeur een  
15 dikte van ten hoogste enkele atomen of relatief vlakke ketens.
9.       Werkwijze volgens één der conclusies 3 - 8, waarbij de actieve groepen met behulp van linkers worden omgezet in aminogroepen.
10.       Werkwijze volgens één der conclusies 3 - 9, waarbij  
20 aan ten minste een aantal actieve groepen, eventueel onder tussenkomst van geschikte linkers, informatiedragende polymeren worden gekoppeld of worden gesynthetiseerd.
11.       Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, waarbij een dragerbasis wordt toegepast met een bijzonder  
25 lage oppervlakteruwheid van ten minste het vlak waarop de kunststof wordt aangebracht, bij voorkeur met een oppervlakteruwheid die in de orde van grootte van atomaire ruwheid ligt of enigszins daarboven.
12.       Werkwijze volgens conclusie 11, waarbij een basis-  
30 drager wordt toegepast waarvan althans het genoemde vlak is vervaardigd uit mica of glas of een qua oppervlakteruwheid, hardheid en poreusiteit vergelijkbaar materiaal, bij voorkeur uit glas.
13.       Werkwijze volgens één der conclusies 1-12, waarbij  
35 het drageroppervlak wordt gevormd door of omvat ten minste één in hoofdzaak sferisch lichaam met een zodanige diameter

5

10

15

20

25

30

35

volgens één der conclusies 14 - 19, waarbij peptiden of organische moleculen of gedeelten daarvan of dergelijke elementen aan het drageroppervlak worden gebonden, waarbij ten minste de gebonden elementen worden voorzien van

5 markers, waarbij de aanwezigheid en de positie van de markers na behandeling van de preparaatdrager met behulp van een microscoop en/of fotografische inrichting worden vastgesteld.

21. Gebruik van een printer voor het op een

10 preparaatdrager volgens één der conclusies 14-19 brengen van te onderzoeken preparaat of daarbij te gebruiken vloeistof, oplossing en/of conjugaat, in het bijzonder een printer van het inktjet- of bubblejet-type of een dergelijke op "drop-on-demand" techniek gebaseerde printer.

15 22. Preparaatdrager, voorzien van een matrix van opneemholten, in het bijzonder geschikt voor gebruik bij een printer volgens conclusie 21, waarbij de holten een inhoud hebben van minder dan 3  $\mu\text{L}$ , meer in het bijzonder tussen 0 en 1  $\mu\text{L}$  en bij voorkeur tussen 0 en 0,1  $\mu\text{L}$ .

20 23. Preparaatdrager volgens conclusie 22, waarbij de holten een binnenoppervlak hebben met een oppervlakteruwheid die lager is dan die van het tussengelegen materiaal.

## UITTREKSEL

Werkwijze voor het vervaardigen van een preparaatdrager, in het bijzonder geschikt voor gebruik bij chemisch en biochemisch onderzoek, waarbij:

- op ten minste één oppervlak van een dragerbasis een laag kunststof wordt aangebracht,
- waarbij de kunststoflaag thermisch en/of chemisch wordt behandeld, zodanig dat de oppervlakteruwheid van de naar de dragerbasis gekeerde zijde van de kunststof wordt verlaagd, terwijl deze niet aan de dragerbasis hecht,
- waarna de kunststof van de dragerbasis wordt afgenomen, waarbij het vrijkomende, relatief gladde oppervlak van de kunststof een drageroppervlak vormt.

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:	
OTTEVANGERS, S. U.	
Vereenigde PCT-Opbureaux	
Nieuwe Parklaan 97	
NL-2587 BN The Hague	
PAYS-BAS	
1 FEB. 2000	bericht gezonden
MAC	P10171PC00

Date of mailing (day/month/year) 03 February 2000 (03.02.00)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference P10171PC00			
International application No. PCT/NL99/00470	International filing date (day/month/year) 21 July 1999 (21.07.99)	Priority date (day/month/year) 21 July 1998 (21.07.98)	
Applicant STICHTING DIENST LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
AU,CN,EP,IL,JP,KP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:  
AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CU,CZ,DE,DK,EA,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,  
HU,ID,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,  
SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW  
The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 03 February 2000 (03.02.00) under No. WO 00/05584

## REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

## REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

## Continuation of Form PCT/IB/308

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF  
THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

Date of mailing (day/month/year) 03 February 2000 (03.02.00)	IMPORTANT NOTICE
Applicant's or agent's file reference P10171PC00	International application No. PCT/NL99/00470
<p>The applicant is hereby notified that, at the time of establishment of this Notice, the time limit under Rule 46.1 for making amendments under Article 19 has not yet expired and the International Bureau had received neither such amendments nor a declaration that the applicant does not wish to make amendments.</p>	



WO 00/00004

ART 34 AMDT  
10 ART 34 AMDT

PCT/NL99/00470

The invention further relates to preparation carrier, characterized by the features of claim 14.

Precisely a preparation carrier having a carrier surface manufactured from plastic, with a surface roughness such that markers of biochemical elements adhered thereto are perceptible and locatable thereon, offers the advantage that such preparation carrier is particularly simple to manufacture and adjust to the preparations to be examined, while such preparation carrier can be used in a very simple manner, in particular also because it is relatively strong. The carrier surface being suitable for specific binding of the preparation, the advantage achieved is that during use, non-bound elements of the preparation can readily be washed away or treated otherwise, readily enabling all kinds of assays, known per se, to be performed on the preparation, such as ELISA. Precisely the specific binding of elements from the preparation to specific active groups of the carrier surface makes these assays possible. The particular flatness of the carrier surface offers the advantage that a particularly high information density can be obtained. The elements in the preparation that are to be examined can be positioned very close together without being indistinguishable.

In further elaboration, a preparation carrier according to the invention is further characterized by the features of claim 18.

WO 00/004

11

PCT/NL99/00470

-COOH groups and -COO-methyl groups in or at least on the surface readily enable formation of amino groups on the carrier surface by means of linkers, which groups are in particular suitable for coupling amino acids thereto. This offers the advantage that in a simple manner optionally presynthesized, complete or incomplete peptides, pieces of PNA, pieces of DNA, sugars, other organic molecules, proteins, viruses, bacteria and cells can be coupled to the surface, to the -COOH group, the -COO-methyl group or the formed amino group. For that matter, other active groups can be used as well. Thus, for instance bromoacetic acid can be synthesized on the carrier surface, to which peptides can subsequently be coupled via an SH-group of the peptides in question.

Hence, a preparation carrier according to the present invention offers the advantage that a great variety of possible chemical bindings of elements to the carrier surface can be obtained, as a result of which the preparation carrier is almost universally applicable.

The invention further relates to the use of microscopy and/or photography for biochemical research, characterized by the features of claim 20.

Precisely the use of a preparation carrier according to the present invention in cooperation with a microscope or a photo apparatus is advantageous, because the particular flatness of the carrier surface of the preparation carrier provides that in each case a proper focusing can be effected,

WO 00/05 4

12

PCT/NL99/00470

so that particularly small color areas or other types of markers can readily be detected and distinguished from one another. Accordingly, in contrast with the known method, a particularly large number of markers can be distinguished on  
5 a relatively small surface, preferably involving the use of a confocal microscope scanner or a like microscope.

The invention further relates to the use of a printer for applying preparation to be examined to a preparation carrier according to the invention, characterized by the  
10 features of claim 21.

Printers, in particular a printer of the inkjet type, bubblejet type or comparable printers, operating by a drop-on-demand technique, such as for instance a printer having a glass capillary from which liquid is dropwise jetted in very  
15 small "drops" under the influence of a deformation of the wall by means of a piezoelectric element, offer the advantage that thus, in a relatively quick manner and with a high accuracy and reproducibility, small to particularly small amounts of slightly liquid preparation can be applied to a  
20 carrier surface in particularly closely spaced, distinct positions. If necessary, conjugates can thereby be added as well. In this manner, preparation carriers can simply and quickly be made ready for examination, while particularly much information can be applied to relatively small  
25 preparation carriers. This renders treatment and analysis of the information on the preparation carriers possible in a particularly simple manner.

WO 00/05

13

PCT/NL99/00470

The invention moreover relates to a microtiter plate or a like preparation carrier, comprising a matrix of wells, characterized by the features of claim 22.

Such preparation carrier is in particular suitable for use with a printer as described in claim 20. The advantage thus achieved is that the surface tension of the liquid to be introduced into the wells can be quickly and unequivocally introduced into the wells and the risk of air inclusion is prevented. Thus, for instance drops of a few tenths of  $\mu\text{l}$  or  $\text{nl}$  or less can be used. As a result, even less preparation and less surface are required. Preferably, yet not necessarily, the wells have an inner surface of a relatively low smoothness, obtained by a method according to any one of claims 1-13.

Preferably, such preparation carrier has outside dimensions of about 2.5 times 7.5 cm, allowing it to be placed in a standard detection apparatus, suitable for microscope slides.

Further exemplary embodiments of methods and preparation carriers according to the invention are given in the further subclaims.

To clarify the invention, exemplary embodiments of a method and a preparation carrier will hereinafter be specified with reference to the accompanying drawings. In these drawings:

Fig. 1 shows a carrier base;

WO 00/05

30

PCT/NL99/00470

Claims

1. A method for manufacturing a preparation carrier, in particular suitable for use in chemical and biochemical research, wherein:
  - on at least one surface of a carrier base, a layer of plastic is provided,
  - wherein the plastic layer is treated thermally and/or chemically, such that the surface roughness of the side of the plastic that faces the carrier base is reduced, while it does not adhere to the carrier base,
  - whereupon the plastic is removed from the carrier base, with the released, relatively smooth surface of the plastic forming a carrier surface.
2. A method according to claim 1, wherein the plastic is provided over the at least one relevant face of the carrier base by melting said plastic at least partially.
3. A method according to claim 1 or 2, wherein as plastic, a monomer or polymer is used having at least one active group for the relevant preparation, in particular a group that can be used for forming an amino group such as a -COOH or a -COO-methyl group.
4. A method according to claim 1 or 2, wherein the carrier surface is treated such that the carrier surface comprises at least one active group for the relevant preparation, in particular a group that can be used for

WO 00/05584

31

PCT/NL99/00470

forming an amino group such as a -COOH or a -COO-methyl group.

5. A method according to claim 4, wherein the carrier surface is grafted with a plastic, in particular by means of a monomer or polymer, preferably acrylic acid or methyl acrylate.

6. A method according to claim 4 or 5, wherein by introduction of -NH<sub>2</sub> groups in, or at least on the carrier surface, the surface roughness thereof is reduced.

7. A method according to any one of claims 4-6, wherein at least the plastic layer on at least the carrier surface is brought into contact with a solution of a monomer, whereupon the plastic and the solution are treated such that polymerization of at least a portion of the monomer occurs on the carrier surface, for which purpose, preferably, the plastic together with the solution is exposed to radiation.

8. A method according to claim 7, wherein the carrier surface is provided with a polymerized adhesive layer of a relatively slight thickness, preferably a thickness of at the most a few atoms or relatively flat chains.

9. A method according to any one of claims 3-8, wherein the active groups are converted into amino groups by means of linkers.

10. A method according to any one of claims 3-9, wherein information-carrying polymers are coupled or synthesized to at least a number of active groups, optionally through the agency of suitable linkers.

**WO 00/05584**

**PCT/NL99/00470**

32

11. A method according to any one of the preceding claims, wherein a carrier base is used having a particularly low surface roughness of at least the face to which the plastic is applied, preferably having a surface roughness in the order of magnitude of atomic roughness or slightly thereabove.

12. A method according to claim 11, wherein a base carrier is used of which at least said face is manufactured from mica or glass or a material which is comparable therewith in respect of surface roughness, hardness and porosity, preferably from glass.

13. A method according to any one of claims 1-12, wherein the carrier surface is formed by or comprises at least one substantially spherical body having a diameter such that in the plastic, on the side facing the carrier, at least one and preferably a matrix of wells is obtained having a volume of less than 3  $\mu$ l, preferably less than 1  $\mu$ l and in particular less than 0.1  $\mu$ l.

14. A preparation carrier for use in examination of a  
20 preparation, in particular a biochemical preparation, said  
preparation carrier having a carrier surface manufactured  
from plastic, wherein the carrier surface has a surface  
roughness such that markers of biochemical elements adhered  
thereto are perceptible and locatable thereon, wherein the  
25 carrier surface is suitable for binding the preparation at  
least covalently.

9. [ ]

WO 00/0555

33

PCT/NL99/00470

- ~~15.~~ A preparation carrier according to claim ~~14~~, wherein  
[the carrier surface is formed by melting the plastic at least  
partially on a carrier base having a surface roughness less  
than or approximately equal to the surface roughness of the  
5 carrier surface.]
- ~~16.~~<sup>15</sup> A preparation carrier according to claim 14 ~~or 15~~,  
wherein the plastic is a polymer, in particular polyethene or  
polypropene.
- ~~17.~~<sup>16</sup> A preparation carrier according to any one of claims  
10 14-~~16~~, wherein the carrier surface is grafted with a monomer  
or polymer, preferably acrylic acid or methyl acrylate.
- ~~18.~~<sup>17</sup> A preparation carrier according to any one of claims  
14-~~16~~, wherein the carrier surface comprises at least -COOH  
or -COO-methyl groups.
- 15 ~~19.~~<sup>18</sup> A preparation carrier according to any one of claims  
14-~~18~~, wherein the carrier surface has a relatively great  
density and preferably a relatively regular distribution of  
active groups.
- ~~20.~~<sup>19</sup> Use of microscopy and/or photography for biochemical  
20 research, wherein a preparation carrier is provided with a  
plastic carrier surface, preferably according to any one of  
claims 14-~~18~~, wherein peptides or organic molecules or  
portions thereof or like elements are bound to the carrier  
surface, wherein at least the bound elements are provided  
25 with markers, wherein the presence and position of the  
markers, after treatment of the preparation carrier, are



WO 00/05584

34

PCT/NL99/00470

established by means of a microscope and/or photographic apparatus.

21. Use of a printer for applying, to a preparation carrier according to any one of claims 14-19, preparation to be examined, or liquid, solution and/or conjugate to be used therefor, in particular a printer of the inkjet or bubblejet type or a like printer based on drop-on-demand technique.
22. 20 A preparation carrier, comprising a matrix of wells, in particular suitable for use with a printer ~~According to~~ ~~claim 21~~, wherein the wells have a volume of less than 3  $\mu$ l, more in particular between 0 and 1  $\mu$ l and preferably between 0 and 0.1  $\mu$ l.
23. 21 A preparation carrier according to claim 20, wherein the wells have an inner surface whose surface roughness is lower than that of the intermediate material. *said wells*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No

PCT/NL 99/00470

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/545 B29C41/12 842D15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N B29C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Y. WANG ET AL.: "Atomic force microscopy study of latex film formation" LANGMUIR, vol. 8, no. 3, March 1992 (1992-03), pages 760-762, XP002099997	1-5, 11-15, 17,22,23
Y	the whole document	7-10,12, 16-20
Y	US 5 627 079 A (J. A. GARDELLA, JR. ET AL.) 6 May 1997 (1997-05-06) the whole document	8-10, 16-20
Y	GB 471 882 A (ROHM & HAAS AG.) 8 June 1936 (1936-06-08) the whole document	7,12,17, 18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 November 1999

Date of mailing of the international search report

11.01.2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

GRIFFITH, G

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/NL 99/00470

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GB 641 284 A (A. BURNES ET AL.) 9 August 1950 (1950-08-09) the whole document	
A	--- DATABASE WPI Section Ch, Week 8818 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A04, AN 88-124238 [18] XP002099998 & JP 63 069641 A (MITSUBISHI RAYON CO., LTD.), 29 March 1988 (1988-03-29) abstract	
A	--- DATABASE WPI Section Ch, Week 9351 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A08, AN 93-410529 [51] XP002099999 & JP 05 309794 A (FUJIMORI IND. CO., LTD.), 22 November 1993 (1993-11-22) abstract	
A	--- DATABASE WPI Section Ch, Week 8911 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A05, AN 89-081149 [25] XP002100000 & JP 01 033166 A (TOA NENRYO KOGYO KK.), 3 February 1989 (1989-02-03) abstract -----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/NL 99/00470**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-20, 22-23

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/NL 99/00470

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## 1. Claims: 1-20, 22-23

Method for manufacturing a carrier, the carrier per se, and the use of microscopy and/or photography for biochemical analysis with the aid of said carrier.

## 2. Claim : 21

Use of a printer for the application of a sample to be analysed, or a solution and/or conjugate for use in the analytical method, to a carrier surface.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/NL 99/00470

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5627079	A	06-05-1997	US 5266309 A	30-11-1993
			US 4946903 A	07-08-1993
GB 471882	A		NONE	
GB 641284	A		US 2579138 A	18-12-1951
JP 63069641	A	29-03-1988	NONE	
JP 5309794	A	22-11-1993	NONE	
JP 1033166	A	03-02-1989	NONE	

## PATENT COOPERATION TREATY

From the  
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PTO/PGT Rec'd 22 JAN 2001

PCT

CONFIRMATION

To:

OTTEVANGERS, S., U.  
Vereenigde  
Nieuwe Parklaan 97  
NL-2587 BN The Hague  
PAYS-BAS

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF  
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT  
(PCT Rule 71.1)

Date of mailing  
(day/month/year)

10.11.2000

Applicant's or agent's file reference  
P10171PC00

**IMPORTANT NOTIFICATION**

International application No.  
PCT/NL99/00470

International filing date (day/month/year)  
21/07/1999

Priority date (day/month/year)  
21/07/1998

Applicant

STICHTING DIENST LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

**4. REMINDER**

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

Name and mailing address of the IPEA/

 European Patent Office  
D-80298 Munich  
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523658 epmu d  
Fax: +49 89 2399 - 4485

Authorized officer

Digiusto, M

Tel. +49 89 2399-8162





## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference <b>P10171PC00</b>		<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. <b>PCT/NL99/00470</b>	International filing date (day/month/year) <b>21/07/1999</b>	Priority date (day/month/year) <b>21/07/1998</b>	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC <b>G01N33/545</b>			
Applicant <b>STICHTING DIENST LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK et al.</b>			
<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of 9 sheets.</p>			
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</li> <li>II <input type="checkbox"/> Priority</li> <li>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</li> <li>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</li> <li>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</li> <li>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</li> <li>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</li> </ul>			
Date of submission of the demand <b>13/01/2000</b>		Date of completion of this report <b>10.11.2000</b>	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  <b>European Patent Office</b> <b>D-80298 Munich</b> <b>Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523658 epmu d</b> <b>Fax: +49 89 2399 - 4465</b>		Authorized officer <b>Weijland, A</b> Telephone No. +49 89 2399 7490 	



**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/NL99/00470

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of *(substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).):*

**Description, pages:**

1-9,14-29	as originally filed		
2a,10-13	as received on	27/06/2000 with letter of	27/06/2000

**Claims, No.:**

1-13	as received on	27/06/2000 with letter of	27/06/2000
14-21	with telefax of	25/10/2000	

**Drawings, sheets:**

1/7-7/7	as originally filed
---------	---------------------

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

Int. national application No. PCT/NL99/00470

**4. The amendments have resulted in the cancellation of:**

- ☐ the description,      pages:  
☐ the claims,      Nos.:  
☐ the drawings,      sheets:

**5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):**

*(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)*

**6. Additional observations, if necessary:****V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-21
	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	1-21
	No:	Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-21
	No:	Claims	

**2. Citations and explanations  
see separate sheet****VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:  
**see separate sheet**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/NL99/00470

Reference is made to the following documents:

- D1: Y. WANG ET AL.: 'Atomic force microscopy study of latex film formation'  
LANGMUIR, vol. 8, no. 3, March 1992 (1992-03), pages 760-762  
D2: US-A-5 627 079 (J. A. GARDELLA, JR. ET AL.) 6 May 1997 (1997-05-06)  
D3: GB 471 882 A (ROHM & HAAS AG.) 8 June 1936 (1936-06-08)

**SECTION I**

1. The amendments filed with the letter of 27.06.2000 and the fax of 25.10.2000 meet the requirements of Article 34(2)(b) PCT.

**SECTION V**

2. Novelty (Article 33(2) PCT)

- 2.1 The subject matter of claims 1-13 is novel.

Claim 1, relating to a method for manufacturing a preparation carrier comprising three steps, is not disclosed in the prior art documents.

- 2.2 The subject matter of claim 14 is novel.

Claim 14, relating to a preparation carrier, is not disclosed in the prior art documents.

- 2.3 The subject matter of claim 19 is novel.

Claim 19, relating to the use of microscopy wherein a preparation carrier is provided according to any of the claims 14-18, is not disclosed in the prior art documents.

- 2.4 The subject matter of claim 20 is novel.

Claim 20, relating to a preparation carrier manufactured according to claims 1-13,

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/NL99/00470

is not disclosed in the prior art documents.

3. Inventive Step (Article 33(3) PCT)

3.1 The subject matter of claims 1-13 would appear to involve an inventive step.

D1 is considered to be the closest prior art. D1 (abstract, page 760, right column, fourth paragraph) describes the preparation of films by pouring drops on an atomically smooth mica surface ("carrier base" according to present claim 1) and allowing the film to dry at 36°C for 4 hours and 36 °C for 4 hours ("treated thermally" according to present claim 1). Atomic force microscopy images are reported for the surfaces of poly(butyl methacrylate) latex films. These films often show a highly ordered surface structure ("smooth surface" according to present claim 1). Claim 1 differs from D1, in that claim 1 describes a method for manufacturing a preparation carrier comprising the removal of the smooth plastic surface from the carrier base forming a carrier surface.

The technical problem may reside in finding uses of films.

The skilled person, equipped with the knowledge of D1, would not be motivated to arrive at the subject matter of claim 1, since the preparation of carriers for biochemical purposes is not suggested in D1.

3.2 The subject matter of claims 14-21 would appear to involve an inventive step.

D2 is considered to be the closest prior art. Claim 14 differs from D2 in that in claim 14 the surface roughness of the carrier base is less or equal than the carrier surface.

The technical problem to be solved would appear to reside in finding an alternative preparation carrier.

The skilled person, equipped with the knowledge of D2, would not be motivated to turn to D3 despite this document describes identical polymerising steps obtaining a high surface smoothness, since the prior art documents do not mention why it

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/NL99/00470

would be important to have a high surface smoothness for a preparation carrier (see section 3.3).

- 3.3 The subject matter of claim 19 would appear to involve an inventive step.

Claim 19, relating to the use of microscopy and/or photography wherein a preparation carrier is provided according to claims 14-18 is not suggested in the prior art documents. The elements to be detected are close together and can nevertheless be distinguished with a microscope or CCD camera (see page 3, lines 7-12 of the description) and these elements are not staggered relative to each other anymore (see page 2, lines 20-23).

- 3.4 The subject matter of claims 20 and 21 would appear to involve an inventive step.

Claim 20, relating to a preparation carrier manufactured according to any of the claims 1-13, is not suggested in the prior art documents (see section 3.2).

**SECTION VIII**

4. The term "preferably" mentioned throughout the application renders the scope of the claims for which protection is sought unclear, since the use of this term renders the following technical features entirely non-limiting to the scope of the claim (see the Guidelines C-III 4.6).